



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**COMPOSICIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LA MICROBIOTA  
INTESTINAL DE JUREL COLA AMARILLA (*Seriola dorsalis*)  
ALIMENTADO CON DIETAS ADICIONADAS CON AJO**

---

Por:

**Rocío Aracely Valenzuela Gutiérrez**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

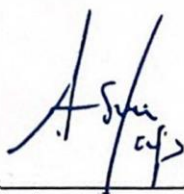
**DOCTORA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

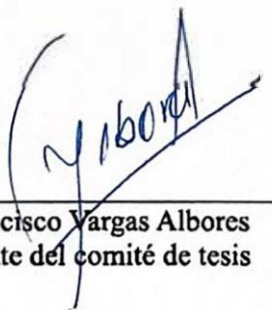
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Rocío Aracely Valenzuela Gutiérrez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias.



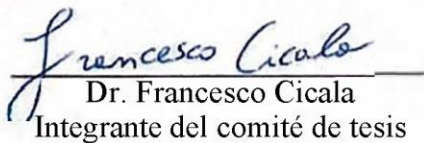
Dr. Marcel Martínez Porchas  
Director de tesis



Dra. Maria Asunción Lago Lestón  
Co-directora de tesis



Dr. Francisco Vargas Albores  
Integrante del comité de tesis



Dr. Francesco Cicala  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Composición y Funcionalidad de la Microbiota Intestinal de Jurel Cola Amarilla (*Seriola dorsalis*) Alimentado con Dietas Adicionadas con Ajo" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Rocío Aracely Valenzuela Gutiérrez, siempre y cuando se dé crédito conespondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo recibido para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por permitirme llevar a cabo mi tesis de Doctorado. A todo el personal por su apoyo y amabilidad.

A mi director de tesis, el Dr. Marcel Martínez Porchas, mi sincero agradecimiento por el invaluable apoyo que me ha brindado durante el transcurso de mi licenciatura, maestría y ahora doctorado. Sus consejos, sugerencias y la paciencia que ha tenido conmigo han hecho una gran diferencia en mi investigación. Gracias por creer en mí y en mi trabajo, y por ayudarme a crecer como investigadora.

A mi co-directora la Dra. Asunción Lago Lestón, mi más sincero agradecimiento. Su apoyo y orientación han sido fundamentales en el éxito de este proyecto. Sus comentarios, sugerencias y críticas constructivas me han permitido crecer académicamente y mejorar la calidad de mi tesis.

A mi comité de tesis, los Dres. Francisco Vargas Albores, y Francesco Cicala y la Dra. Mónica Hernández Rodríguez, por su dedicación y apoyo en la evaluación y orientación de mi proyecto de tesis. Su compromiso con mi trabajo ha sido fundamental en mi viaje académico.

A los Dres. Candy Elizabeth Armuelles Bernal, Mónica Hernández Rodríguez y Benjamín Barón Sevilla, investigadores del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por haberme proporcionado las muestras de intestino para la realización de esta tesis doctoral, procedentes de los bioensayos por ellos diseñados y realizados.

A la M.C. Yamne Ortega, por su apoyo y disposición y por la secuenciación de las muestras durante mi tiempo de trabajo en el laboratorio de Metagenómica del Departamento de Innovación Biomédica de CICESE.

A la Dra. y mejor amiga Estefanía Garibay Valdez, por tu apoyo inquebrantable y tu compañía durante todo mi doctorado. Tus palabras de aliento y tu paciencia para escucharme han sido un alivio en los momentos de estrés y desafíos académicos. Siempre has estado ahí para celebrar mis logros y levantarme cuando las cosas se volvían difíciles.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Marina de CIAD, por haber compartido

este viaje de tesis conmigo. Su apoyo, colaboración y amistad han sido fundamentales en mi desarrollo académico. Valoraré siempre los momentos de trabajo en equipo y las risas compartidas en el laboratorio y cocina. Espero que esta amistad perdure en el futuro, y que podamos seguir celebrando éxitos juntos.

A los amigos que hice en CIAD (Grupo de apoyo), gracias por su amistad, palabras de apoyo y compañía que hicieron de estos años de trabajo más llevaderos y felices.

A mi familia, por el amor y el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida. Han sido mi refugio y mi inspiración, y no puedo expresar cuánto valoro su presencia en mi vida. A través de cada desafío y logro, ustedes han estado a mi lado, y no puedo agradecerles lo suficiente por eso. Espero que esta expresión de gratitud refleje cuán especiales son para mí y cuánto significan en mi vida.

A la Dra. Teresa Gollas Galván (QEPD), fue una parte fundamental de mi formación académica. Aunque ya no este físicamente con nosotros, quiero expresar mi profundo agradecimiento por su apoyo y consejos que han dejado una huella indeleble en mi camino.

## **DEDICATORIA**

*A Dios, por darme fortaleza y resiliencia.*

*A mi esposo Tadeo y a mi hija Oriana, los tesoros de mi vida.*

*A mis padres y hermanas, por su apoyo durante toda mi vida.*

*A la Familia Olivarria Parra, por su cariño.*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>CONTENIDO</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	16
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	17
2.1. Acuicultura en México .....	17
2.2. Biología y Cultivo del Jurel Cola Amarilla ( <i>Seriola dorsalis</i> ).....	17
2.3. Uso de Inmunoestimulantes en el Cultivo de Peces .....	19
2.4. El Ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y sus Actividades Biológicas en el Cultivo de Peces .....	22
2.4.1. Actividad Antibacteriana .....	25
2.4.2. Actividad Antioxidante .....	27
2.4.3. Actividad Antiviral .....	28
2.4.4. Actividad Antiparasitaria .....	29
2.4.5. Actividad Inmunoestimulante .....	30
2.4.6. Promotor de Crecimiento.....	31
2.4.7. Modulación de la Microbiota Intestinal .....	32
2.5. Estudio de la Microbiota Intestinal de Jurel Cola Amarilla ( <i>Seriola dorsalis</i> ) .....	33
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	36
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	37
4.1. Objetivo General.....	37
4.2. Objetivos Específicos .....	37
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	38
5.1. Bioensayo .....	38
5.1.1 Dietas .....	38
5.1.2 Diseño Experimental.....	39
5.1.3 Colección de Muestra .....	39
5.2. Extracción de ADN .....	40
5.3. Creación y Normalización de Librerías para Secuenciación.....	40
5.4. Análisis Bioinformático.....	41
5.4.1. Análisis de Calidad y Asignación Taxonómica.....	41

## CONTENIDO (continuación)

5.4.2. Análisis de Diversidad.....	42
5.4.3. Análisis de Abundancia Diferencial (DA).....	42
5.4.4. Predicción Funcional .....	43
5.4.5. Análisis de Redes de Interacción.....	44
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
6.1. Extracción y Amplificación de ADN .....	45
6.2. Control de Calidad de las Secuencias.....	47
6.3. Análisis de Diversidad.....	50
6.4. Perfil Taxonómico .....	51
6.5. Análisis de Abundancia Diferencial (DA).....	54
6.6. Predicción Funcional .....	58
6.7. Análisis de Redes de Interacción.....	62
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>77</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 Jurel cola amarilla ( <i>S. dorsalis</i> ).....	18
2 Biosíntesis de alicina.....	25
3 Amplicones de la región V4 del gen 16S ARNr en gel de agarosa al 1%. a) Amplicones obtenidos sin limpieza. b) Amplicones obtenidos después del proceso de limpieza.....	47
4 Gráficas de calidad de secuencias. a) Secuencias sentido (forward). b) Secuencias anti-sentido (reverse).....	48
5 Control de calidad de las secuencias obtenidas y secuencias utilizadas para el análisis en QIIME2.....	49
6 Curva de rarefacción que muestra la secuenciación en cada una de las muestras. En el eje X se describe la profundidad de secuenciación por muestra y en el eje Y el número de ASV observados.....	50
7 Tablas de los índices de diversidad alfa de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla ( <i>S. dorsalis</i> ) alimentado con dietas adicionadas con diferentes concentraciones de polvo de ajo: T1= 4%, T2= 10%, T3= 25%, C= control.....	51
8 Perfil taxonómico de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla ( <i>S. dorsalis</i> ) alimentado con diferentes dietas adicionadas con ajo: T1= 4% T2= 10%, T3= 25%, C= control.....	53
9 Análisis de coordenadas principales (PcoA) de la microbiota intestinal detectada en el intestino del jurel cola amarilla ( <i>S. dorsalis</i> ) alimentado con diferentes dietas adicionadas con ajo. a) PCoA del intestino anterior, b) PCoA del intestino posterior. Los plots se derivan de la prueba Unifrac ponderada. DC: dieta comercial, PA=polvo de ajo.....	54
10 Ocurrencia de Familias a través de los segmentos intestinales (A) y tratamientos (B) con Control, 4 (1), 10 (2) y 25% (3) de inclusión de ajo en la dieta del jurel cola amarilla. Los puntos bajo la gráfica indican diferencias significativas en la ocurrencia de familias de bacterias entre las secciones de intestino y tratamientos.	57
11 Abundancia diferencial de los principales grupos taxonómicos entre los tratamientos en el intestino anterior. El título del panel indica la dirección de la abundancia diferenciada. CD= dieta comercial.....	58
12 Abundancia diferencial de los principales grupos taxonómicos entre los tratamientos en el intestino posterior. El título del panel indica la dirección de la abundancia diferenciada.....	59
13 Diagrama de Venn donde se observan a) las funciones compartidas y exclusivas entre tratamientos y b) en la tabla se indican las funciones únicas presentes en cada tratamiento.....	60

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
14	Análisis discriminante lineal (LefSe), efecto-tamaño (LDA) en funciones de nivel 3 de KEGG detectadas en la microbiota intestinal del jurel cola amarilla ( <i>S. dorsalis</i> ) alimentados con diferentes dietas adicionadas con ajo: T1=4%, T2= 10%, T3= 25%, C= control.....	61
15	Mapa de calor de funciones potenciales de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla ( <i>S. dorsalis</i> ) alimentado con diferentes dietas adicionadas con ajo: T1= 4%, T2= +10%), T3= 25%), C= control.....	62
16	<i>Volcano Plot</i> de la significancia de las interacciones entre familias de bacterias. a) Comparación intestino anterior y posterior, b) comparación entre control y tratamiento tres en intestino, c) comparación entre control y tratamiento tres en intestino posterior. pval y pval.adj: significancia a $p<0.05$ .....	64
17	Gráfico de interacción de redes para comunidades microbianas en intestino anterior (IA) e intestino posterior (IP) a nivel de familia, utilizando análisis de estimación dispersa de correlaciones entre microbiomas (SECOM).....	66
18	Gráfico de interacción de redes para comunidades microbianas en los tratamientos a nivel de familia en intestino anterior, utilizando análisis de estimación dispersa de correlaciones entre microbiomas (SECOM).....	67
19	Gráfico de interacción de redes para comunidades microbianas en los tratamientos a nivel de familia en intestino posterior, utilizando análisis de estimación dispersa de correlaciones entre microbiomas (SECOM).....	68

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Composición bioquímica del ajo ( <i>A. sativum</i> ).....	23
2	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L) en las muestras de intestino por tratamiento. PA: Polvo de ajo.....	45
3	Análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) después de comparaciones pareadas entre las comunidades bacterianas detectadas en el intestino anterior y el intestino posterior del jurel cola amarilla de California ( <i>S. dorsalis</i> ) alimentados con dietas con diferentes concentraciones de ajo ( <i>A. sativum</i> ) (control, 4, 10 y 25%).....	55

## RESUMEN

El ajo (*Allium sativum*) ha demostrado reforzar el sistema inmune de peces y modular la composición de la microbiota intestinal, que, a su vez, juega un papel importante en la nutrición y salud del hospedero. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del uso de alimento adicionado con ajo en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de jurel cola amarilla (*Seriola dorsalis*), un pez marino con potencial acuícola. Para ello, se alimentaron juveniles de jurel con dietas adicionadas con diferentes concentraciones de polvo de ajo (4%, 10% y 25%) durante 30 días. Se llevó a cabo la extracción y cuantificación de ADN genómico de dos secciones de intestino del jurel (anterior y posterior) y se amplificó la región V4 del gen 16S de las muestras para secuenciación utilizando en un equipo MiSeq de Illumina. Posteriormente, se realizó el procesamiento de secuencias, asignación taxonómica e índices de abundancia utilizando la suite QIIME2 y se predijeron las funciones (PICRUST2). Para determinar las diferencias significativas entre tratamientos, se realizó un análisis de varianza permutacional a una  $p < 0.05$ , un análisis de abundancia diferencial (LEfSe en plataforma Galaxy) y por último un análisis de redes de interacción (MicrobiomeAnalyst). Los resultados revelaron que existen diferencias entre las comunidades bacterianas presentes en las dos secciones de intestino y entre tratamientos, disminuyendo la diversidad bacteriana en función del aumento de la concentración de ajo. La clase Gammaproteobacteria aumentó a medida que incremento la concentración de ajo en las dietas y las clases Alphaproteobacteria, Bacteroidia y Planctomycetes disminuyeron a medida que incremento la concentración de ajo en las dietas. Además, también se presentaron cambios en las funciones predichas dependiendo de la concentración de ajo. Las principales funciones encontradas fueron las relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, el ciclo de la urea y la vía de las pentosas-fosfato degradación de la glucosa. Las familias de bacterias que provocaron estas diferencias en las comunidades bacterianas entre secciones de intestino fueron Vibrionaceae, Pseudomonadaceae y Burkholderiaceae, y entre tratamientos Flavobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae, Saprospiraceae y Xanthobacteriaceae. Por otro lado, las familias clave en la comunidad bacteriana como Flavobacteriaceae y Pseudomonadaceae presentan interacciones positivas lo que puede significar relaciones simbióticas. Los resultados sugieren que la suplementación con ajo en la dieta, particularmente a la concentración más elevada, no fue beneficiosa para el jurel, ya que indujo

cambios negativos en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal.

**Palabras claves:** *Seriola dorsalis*, microbiota intestinal, ajo, perfil taxonómico, predicción funcional.

## ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum*) has been shown to strengthen the immune system of fish and modulate the composition of the intestinal microbiota, which, in turn, plays an important role in the nutrition and health of the host. The objective of the present work is to evaluate the effect of the use of feed added with garlic on the composition and functionality of the intestinal microbiota of yellowtail (*Seriola dorsalis*), a marine fish with aquaculture potential. To do this, juvenile yellowtail was fed diets added with different concentrations of garlic powder (4%, 10%, and 25%) for 30 days. The extraction and quantification of genomic DNA was carried out from two sections of yellowtail intestine (anterior and posterior) and the V4 region of the 16S gene was amplified from the samples for sequencing using an Illumina MiSeq equipment. Subsequently, sequence processing, taxonomic assignment, and abundance indices were performed using the QIIME2 suite and functions were predicted (PICRUSt2). To determine significant differences between treatments, a permutational analysis of variance at  $p < 0.05$ , a differential abundance analysis (LEfSe on Galaxy platform), and finally an interaction network analysis (MicrobiomeAnalyst) was performed. The results revealed that there are differences between the bacterial communities present in the two sections of the intestine and between treatments, decreasing bacterial diversity as a function of increasing garlic concentration. The Gammaproteobacteria class increased as the garlic concentration in the diets increased and the Alphaproteobacteria, Bacteroidia, and Planctomycetes classes decreased as the garlic concentration in the diets increased. In addition, changes in the predicted functions also occurred depending on the concentration of garlic. The main functions found were those related to carbohydrate metabolism, the urea cycle, and the pentose-phosphate pathway for glucose degradation. The families of bacteria that caused these differences in bacterial communities between intestine sections were Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, and Burkholderiaceae, and between treatments Flavobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae, Saprospiraceae, and Xanthobacteriaceae. On the other hand, key families in the bacterial community such as Flavobacteriaceae and Pseudomonadaceae present positive interactions which may mean symbiotic relationships. The results suggest that dietary garlic supplementation, particularly at the highest concentration, was not beneficial for yellowtail, as it induced negative changes in the composition and functionality of the intestinal microbiota.

**Key words:** *Seriola dorsalis*, gut microbiota, garlic, taxonomic profile, functional prediction.

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es uno de los sectores de más rápido crecimiento en México, debido al constante aumento de la demanda de productos pesqueros y acuícolas. La piscicultura aporta más de la mitad del volumen de la producción en el país. El cultivo de jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) es una especie que en México lleva menos de una década de desarrollo (SAGARPA, 2018). El jurel es un pez marino de distribución mundial catalogado como una especie con potencial acuícola, debido a sus buenas características de adaptación, su carne de alta calidad y valor comercial (Avilés-Quevedo y Castello-Orvay, 2004). Sin embargo, la intensificación de la acuicultura y la implementación del cultivo de peces en altas densidades, aumentan las probabilidades de la aparición de enfermedades infecciosas (Alexander *et al.*, 2010). Una de las estrategias para el control de enfermedades es el uso de inmunoestimulantes, sustancias que mejoran los mecanismos de defensa del sistema inmune en organismos acuáticos y modulan la composición y metabolismo de la microbiota intestinal la cual juega un papel importante en la nutrición y salud de su hospedero (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

Uno de los inmunoestimulantes más usados en la acuicultura es el ajo (*Allium sativum*), que contiene compuestos bioactivos como la alicina, que le confiere propiedades antimicrobianas, antioxidantes, hipertensivas y refuerza el sistema inmune (Guo *et al.*, 2015). El efecto de la adición de ajo en alimento, se ha probado en distintas especies de peces, aumentando las tasas de supervivencia, el rendimiento en el crecimiento, la resistencia a enfermedades y la modificación de la composición microbiana intestinal, la cual juega un rol esencial en el desarrollo y fisiología de su hospedero, así como en la inhibición de patógenos y activación del sistema inmune. Sin embargo, no se ha estudiado a detalle el efecto de este inmunoestimulante en la estructura y perfil funcional de la microbiota intestinal de peces, en específico en jurel. Por ello, se estableció como objetivo evaluar el efecto del uso de alimento adicionado con diferentes concentraciones de ajo en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de jurel cola amarilla (*S. dorsalis*).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Acuicultura en México

La industria de la acuicultura es uno de los sectores de más rápido crecimiento en el mundo; en este contexto, la acuicultura por sí sola contribuyó con el 49.2% de la producción pesquera mundial en 2020. De este porcentaje, la mayoría se atribuye a la piscicultura (58 millones de toneladas), seguida de los moluscos (18 millones de toneladas) y los crustáceos (11 millones de toneladas) (FAO, 2022). México se encuentra en el lugar número 24 en materia acuícola a nivel mundial y de acuerdo con la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA), en el año (2019), la producción nacional pesquera y acuícola alcanzó un volumen total de 1,886,796 toneladas en peso vivo. Esta producción fue un 13% menor a la registrada en el año 2018, cuando se obtuvieron 2,159,650 toneladas. En 2020, la producción nacional ascendió a 1,950,011 toneladas, de las cuales 351,002 fueron producidas por acuicultura, correspondiente a un 18 % de la producción nacional. Las principales especies producidas en México por sus mayores aportaciones en volumen y valor son el camarón, la tilapia y el ostión; siendo la piscicultura la que aporta más de la mitad del volumen de producción en el país.

### 2.2. Biología y Cultivo del Jurel Cola Amarilla (*Seriola dorsalis*)

El jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) mejor conocido como jurel cola amarilla, pertenece a la familia Carangidae (Bycov, 1985), con amplia distribución a nivel mundial. El jurel es un pez pelágico marino que vive en mar abierto; se encuentra en aguas templadas y subtropicales desde Canadá hasta Chile (Abbink *et al.*, 2012). El jurel presenta una forma alargada comprimida lateralmente, posee dos aletas dorsales, una aleta anal precedida por dos espinas distintas, pedúnculo caudal delgado y una aleta caudal profundamente furcada. El color de su dorso es azul oscuro y vientre plateado a blanco con una línea bronce bien definida que demarca ambos colores (Avilés-Quevedo y Castello-Orvay, 2004) (Figura. 1).



**Figura. 1.** Jurel cola amarilla (*S. dorsalis*)

En su medio natural el jurel se alimenta principalmente de peces, ocasionalmente de cefalópodos y crustáceos. Habita aguas costeras y oceánicas, estuarios y arrecifes, hasta una profundidad de 825 m. Es un organismo asincrónico que se reproduce todo el año según las condiciones ambientales. La reproducción comienza al primer año de vida al alcanzar 1.5 kg. Las hembras son ligeramente más grandes que los machos. Los huevos, larvas y alevines son pelágicos. A tallas mayores de 20 cm y 250 g, durante su etapa demersal, los alevines habitan en estuarios, arrecifes rocosos o coralinos hasta alcanzar la madurez sexual, posteriormente regresan a la columna de agua para migrar y aparearse (SAGARPA, 2018).

El cultivo de jurel en México lleva menos de una década en desarrollo y hasta la fecha se encuentran vigentes concesiones de acuicultura comercial para Baja California y Baja California Sur, así como un permiso para la acuicultura de fomento en Sonora (SAGARPA, 2012). Con relación a su producción, no se cuenta con estadísticas oficiales, pero en 2010 se registraron cuatro UPAs (unión de pequeños agricultores) comerciales y un laboratorio para la producción de crías en Baja California Sur; mientras que, en el mismo año, Baja California reportó una UPA con producción menor a una tonelada. Sin embargo, el jurel cola amarilla tiene gran potencial acuícola, ya que es un organismo de rápido crecimiento, se adapta al confinamiento y al alimento formulado; además, su carne es de gran calidad y alto valor comercial.

La especie de jurel cola amarilla se encuentra naturalmente en las aguas mexicanas, lo que permite la captura de juveniles silvestres para el inicio del cultivo (Avilés-Quevedo y Castello-Orvay, 2004). Por lo anterior, el cultivo de jurel *S. dorsalis*, representa una buena opción para su explotación acuícola, gracias a sus características físicas y de adaptación para productores que cuentan con las condiciones ambientales que permiten su desarrollo.

La intensificación de la acuicultura para satisfacer la exigencia del mercado ha detonado el cultivo de peces en altas densidades, lo que aumenta las probabilidades de exponer a los organismos a un estrés elevado. Esto provoca la supresión del sistema inmune y, por tanto, favorece la aparición de enfermedades infecciosas en los organismos, elevando las tasas de mortalidad, lo que resulta en pérdidas económicas (Alexander *et al.*, 2010). El uso de antibióticos se ha implementado como medida para el control de enfermedades; sin embargo, su uso indiscriminado estimula la aparición de bacterias resistentes, causando daños a la salud y el medio ambiente (Harikrishnan *et al.*, 2012, Magrone *et al.*, 2016).

Por lo anterior, se han establecido estrategias más amigables para el ambiente y que, además, consideran el impacto para los microorganismos del medio que realizan múltiples funciones como la degradación de compuestos y reciclaje de nutrientes. El uso de probióticos, prebióticos y simbióticos, ofrece ambas soluciones: 1) crear protección para los organismos al inducir un ambiente hostil para los patógenos, al producir compuestos antimicrobianos y 2) competir por nutrientes y espacio. Adicionalmente, se cuenta con evidencia de que estos elementos también estimulan la proliferación de bacterias benéficas en la microbiota intestinal (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018). La microbiota participa en varias funciones del hospedero (Galindo-Villegas *et al.*, 2012). Por ejemplo, la microbiota intestinal juega un papel importante en la nutrición, protección contra bacterias patógenas y desarrollo del sistema inmune del hospedero (Bikel *et al.*, 2015, Ramirez y Romero, 2017). Actualmente el estudio de la microbiota intestinal ha ido en aumento en especies con importancia acuícola como el camarón blanco, la trucha y la tilapia. Esto con el fin de conocer su composición, funcionalidad e interacciones con el hospedero, permitiendo conocer más sobre el rol de la microbiota en la biología del hospedero, e incluso representando un biomarcador del estado de salud y desarrollo (Tran *et al.*, 2018).

### 2.3. Uso de Inmunoestimulantes en el Cultivo de Peces

En el cultivo de peces entre el 40 y 60% de la producción se pierde como resultado de enfermedades infecciosas (Stentiford *et al.*, 2012, Raman, 2017). Durante largo tiempo, agentes quimioterapéuticos, incluidos los antibióticos, se han aplicado como remedios eficaces para los

brotos de enfermedades en los animales acuáticos; sin embargo, debido a su uso excesivo, los patógenos acuáticos se han vuelto resistentes a dichos tratamientos. Esta resistencia emergente no solo compromete la salud de los animales acuáticos, sino que también plantea una amenaza directa para la salud humana, ya que existe el potencial de que estos patógenos resistentes se propaguen a través de la cadena alimentaria y lleguen a los consumidores finales. Es imperativo abordar este problema de resistencia de antibióticos en el entorno acuático mediante estrategias de gestión más sostenibles, a fin de salvaguardar la salud de los ecosistemas y las poblaciones humanas. Afortunadamente, la acuicultura moderna requiere sistemas sostenibles y los antibióticos están siendo reemplazados por alternativas ecológicas, incluidos probióticos e inmunoestimulantes (Akhter *et al.*, 2015, Hai, 2015, Zorriehzahra *et al.*, 2016, Banerjee y Ray, 2017, Pérez-Sánchez *et al.*, 2018, Zaineldin *et al.*, 2018, Soliman *et al.*, 2019, Anran Wang *et al.*, 2019).

Los inmunoestimulantes son agentes que activan el sistema inmunológico de manera específica y no específica. Los inmunoestimuladores específicos desencadenan respuestas inmunitarias específicas al interactuar con linfocitos B y células T, mientras que los inmunoestimuladores no específicos potencian la respuesta inmunitaria sin requerir una especificidad antigénica definida, mediante la estimulación de componentes del sistema inmunitario (Ganguly *et al.*, 2010). Estos, comenzaron a ser utilizados en acuicultura como potenciadores de la respuesta inmune inespecífica de los peces, aumentando la resistencia a enfermedades (Vásquez-Piñeros *et al.*, 2012). Aunque los prebióticos son inmunoestimulantes, se han excluido de la definición típica de inmunoestimulante, que se refiere a otro tipo de compuestos como elementos estructurales de bacterias (lipopolisacáridos, glicoproteínas, lipopéptidos), productos de  $\beta$ -1-3 / 1-6 glucanos, y algunos otros carbohidratos con estructuras complejas, vitaminas, carotenos, minerales, probióticos (microorganismos) y extractos de plantas (Ganguly *et al.*, 2013).

Entre los inmunoestimulantes más utilizados en peces, se encuentran los prebióticos ( $\beta$ -glucanos,  $\beta$ -glucooligosaccharides (BGO), fructooligosaccharide (FOS) e inulina, entre otros) y los probióticos (*Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp.) (Vásquez-Piñeros *et al.*, 2012). Los primeros estudios con inmunoestimulantes fueron en peces teleósteos, en donde las sustancias se suministraban por inyección o mediante el baño de animales, lo cual implica manipulación del animal con el consiguiente estrés. Una técnica más reciente para la aplicación de inmunoestimulantes es a través del alimento, lo que ofrece la ventaja de no manipular a los organismos (Rodríguez *et al.*, 2003).

Los estudios sobre el efecto de  $\beta$ -glucanos y probióticos en distintas especies de peces, han encontrado que, dependiendo de la cantidad añadida a la dieta los  $\beta$ -glucanos contribuyen a la nutrición del organismo. Además, estimulan el sistema inmune de peces inmunocomprometidos, aumentando su resistencia a enfermedades e incrementando la tasa de supervivencia (El-Boshy *et al.*, 2010, Lin *et al.*, 2011). En cuanto a la aplicación de probióticos en la acuicultura, se ha demostrado su efecto en la modulación del microbiota del hospedero, beneficiando la competencia contra patógenos, mejorando la sobrevivencia, la actividad enzimática y la respuesta inmune frente al estrés (Sorroza, 2012, Gupta y Dhawan, 2013, Newaj-Fyzul *et al.*, 2014).

Por otro lado, el uso de plantas y sus extractos como inmunoestimulantes se popularizó en la acuicultura gracias a su bajo costo, fácil incorporación al alimento y poco impacto ambiental (Aly y Mohamed, 2010). Estos contienen diversos compuestos bioactivos con propiedades biológicas y útiles para la acuicultura, como antiestrés, inmunoestimulantes, antiparasitarios (bacterianos, fúngicos, virales y ectoparásitos), promotores del crecimiento, entre otros (Reverter *et al.*, 2017). Algunos ejemplos de plantas utilizadas en acuicultura incluyen canela (*Cinnamomum verum*), sándalo (*Santalum 2liscí*), pasto bermuda (*Cynodon dactylon*), orégano (*Origanum heracleoticum*) y ajo (*Allium sativum*). En acuicultura, el ajo se utiliza como complemento alimenticio en dietas para peces induciendo un mejor rendimiento de crecimiento, estimulando el apetito, mejorando el sistema inmunológico y regulando inclusive los patógenos al inhibir eficazmente bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, *Myxococcus 2liscícola*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda.*, *Aeromonas punctata f. intestinalis* y *Yersinia ruckeri* (Guo *et al.*, 2015, Lee y Gao, 2012).

El bajo valor comercial y la accesibilidad de algunas plantas facilitan su uso como extractos crudos o el compuesto bioactivo a gran escala en la acuicultura, ya sea por aplicación directa o por incorporación en alimentos comerciales (Awad y Awaad, 2017). Sin embargo, la actividad biológica de las plantas puede variar considerablemente según la parte considerada y el tipo de extracto; por lo tanto, se requiere información sobre los compuestos bioactivos de las plantas y su dosis adecuada para prevenir efectos tóxicos en los organismos (Kavitha *et al.*, 2012, Reverter *et al.*, 2017). Las partes de las plantas que se utilizan comúnmente para su aplicación en la acuicultura incluyen las hojas, la planta pulverizada, la raíz, las semillas, las cortezas, los frutos y las flores (Reverter *et al.*, 2017).

Aunque muchas plantas se utilizan para fines específicos, hay otras cuyo uso está destinado a una amplia variedad de fines; tal es el caso del ajo (*A. sativum*), cuya aplicación ha sido casi universal

en animales de granja para múltiples propósitos (Vallejo Villalobos *et al.*, 2008, Abdel-Tawwab *et al.*, 2020, Adineh *et al.*, 2020).

El ajo es una especia de uso común cuyos beneficios para la salud se han documentado ampliamente. Contiene varios compuestos bioactivos, que incluyen alicina y otros compuestos orgánicos azufrados, fenoles, polisacáridos y saponinas (Szychowski *et al.*, 2018). Este arsenal confiere al ajo atributos como actividad antimicrobiana, antioxidante, antihipertensivos, además de antiinflamatoria, anticancerígena, también se le reconoce como un protector cardiovascular antidiabético y antiobesogénico. (Guo *et al.*, 2012, Yun *et al.*, 2014, Szychowski *et al.*, 2018, Shang *et al.*, 2019).

#### 2.4. El Ajo (*Allium sativum*) y sus Actividades Biológicas en el Cultivo de Peces

El ajo (*A. sativum*) es una planta perenne perteneciente a la familia Liliaceae y se ha utilizado durante siglos como aromatizante, medicina tradicional y como alimento funcional para mejorar la salud del ser humano. Los seres humanos han utilizado el ajo (Orden Asparagales, Familia Amaryllidaceae) durante más de 7000 años con fines culinarios y medicinales. Es un producto vegetal popular con beneficios para el tratamiento de la insuficiencia venosa, la hipertensión, la acción antibacteriana y muchos otros (Gambogou *et al.*, 2018b, Gbekley *et al.*, 2018). La planta de ajo tiene un sistema radicular con una raíz bulbosa formada por seis a doce bulbos, reunidos en su base a través de una fina película para formar la "cabeza de ajo". Cada bulbo está rodeado por una fina lámina protectora membranosa blanca o rojiza. Del bulbo emergen ramas fibrosas que se introducen en el suelo para alimentar y anclar la planta. Los tallos de la planta crecen más de 55 centímetros de largo, terminando con las flores (Greco, 2011).

La composición aproximada del ajo registra un promedio de 65% de agua (en comparación con más del 85% de las verduras frescas), 27.5% de carbohidratos, 2% de proteínas y 4.7% de fibra (Gambogou *et al.*, 2018a). La composición bioquímica del ajo se muestra en el cuadro 1.

Los compuestos organosulfurados representan el 2-3% de la composición del ajo, y la mayoría de sus propiedades farmacológicas se atribuyen a estos compuestos (Darbyshire y Henryf, 1981, Gambogou *et al.*, 2018a). Estos pueden inhibir el daño causado por reacciones oxidativas generadas

por la vejez o enfermedades, reducir los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre, tener efectos antiinflamatorios, antiaterogénicos y antitrombóticos por su capacidad para inhibir la síntesis de prostanoïdes (Borek, 2001). Los compuestos orgánicos de azufre más comunes incluyen S-alilcisteína (SAC), S-alil-mercaptocisteína (SAMC), aliina y alicina, que son abundantes en extractos de ajo envejecido y maceración de ajo (Drago Serrano *et al.*, 2006).

**Cuadro 1.** Composición bioquímica del ajo (*A. sativum*) reportada por Anton (2016) y Gambogou *et al.* (2018a).

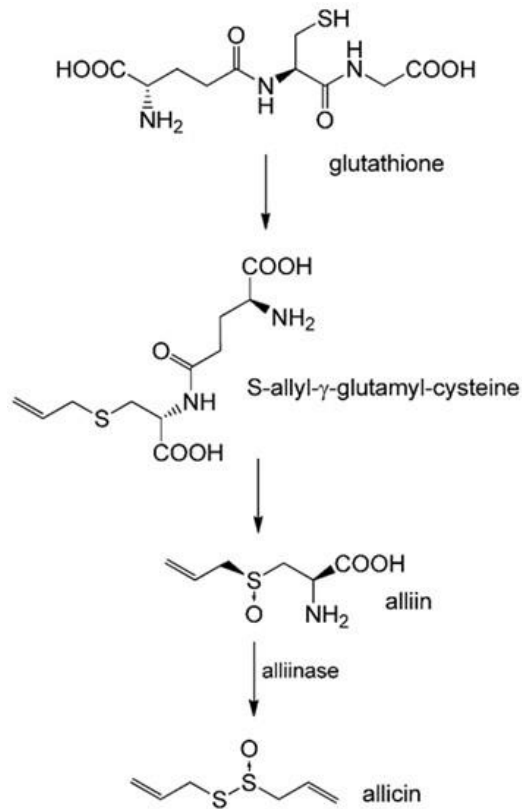
Carbohidratos	Monosacáridos (fructosa, glucosa)
	Disacáridos (sacarosa, lactosa)
	Trisacáridos (rafinosa)
	Tetrasacáridos (tetrafructosa, escorodosa)
	Depolisacáridos (almidón, dextrina, inulina, fructosano)
	D-galactano
	L-arabinosa
	Pectinas fructano D-fructano
Lípidos	Ácidos grasos (ácido linoleico, ácido linolénico, ácido oleico, ácido palmítico)
	Triglicéridos
	Fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina)
	Prostaglandinas (prostaglandina A, prostaglandina E, prostaglandina F)
Proteínas	Proteínas y aminoácidos (lisina, treonina, valina, metionina, isoleucina, triptófano, fenilalanina, leucina, histidina, arginina, ácido aspártico, serina, glutamina, prolina, glicina, alanina y cisteína).
Vitaminas	Vitamina A
	Vitamina B1
	Vitamina B2
	Vitamina B6
	Vitamina C Vitamina E
Compuestos sulfurados	Alicina y derivados de alicina (varios trisulfuros, ajoeno, dialil-disulfuro)
	Aliina (S-alilcisteína-sulfóxido)
	Glutamyl-S-alilcisteína
	Metino (S-metilcisteína-sulfóxido) Isoalina (S-trans-1- propenilcisteína-sulfóxido)
Minerales	Fosfato
	Potasio
	Magnesio
	Cobre
	Hierro Manganeso

	Zinc Selenio (dimetilselenida, metil-éster-ácido metanosulfenoselenoico, dimetildiselenida, bi- (metilnetión) -selenida, ácido alilmetilsulfuro, ácido metil-éster-2-propensulfenoselenoico, ácido propilester-1-propénico)
Pigmentos	Clorofila Carotenoides Antocianinas (estos son pigmentos solubles en agua que dan un color rojo, violeta o azul)
Otros compuestos	Ácido fenólico Ácido orgánico Saponósidos Flavonoides Fitohemaglutininas Giberelinas A3 y A7

La aliina es el compuesto organosulfurado que se encuentra en mayor proporción y es una sustancia inodora contenida en el bulbo de ajo fresco (Torija *et al.*, 2013). Cuando se corta o machaca el bulbo o diente de ajo, la aliina entra en contacto con la enzima aliinasa (suaviza las cisteínas del sulfóxido citosólico) y se obtiene la alicina (Figura 2), dando al ajo su olor característico y algunos de sus efectos farmacológicos y propiedades terapéuticas (Gökalp, 2018).

La alicina es un compuesto organosulfuro soluble en grasa, citotóxico, volátil y altamente inestable (Amagase *et al.*, 2001). Es el compuesto más activo del ajo y está asociado con actividades antisépticas, antivirales, antifúngicas, antiparasitarias y antibacterianas (Guo *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2014). Por ejemplo, el ajo ha demostrado ser un agente antiectoparásito; su uso como aceite es eficaz contra protozoos como *Plasmodium* spp, *Trypanosoma* spp, *Leishmania* spp y *Giardia* spp (Anthony *et al.*, 2005). Los extractos acuosos de ajo también son útiles contra himenolepiasis y giardiasis (Soffar y Mokhtar, 1991). La evidencia ha demostrado que el ajo es eficaz contra los nematodos; por ejemplo, los extractos acuosos pueden controlar *Trichuris muris* y *Angiostrongylus cantonensis* (Klimpel *et al.*, 2011). Como tiosulfinato, la alicina es una especie de azufre reactivo que provoca una reacción redox con los grupos tiol del glutatión y las proteínas, mecanismo que es esencial para su actividad biológica.





**Figura 2.** Biosíntesis de alicina. Se parte de glutatión que se hidroliza a  $\gamma$ -glutamil-S-alilcisteína y posteriormente se oxida a aliina (precursor inactivo de la alicina) por la enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa. Finalmente, la aliina es hidrolizada por la acción de la enzima aliinasa para producir alicina. Imagen modificada de Borlinghaus et al., (2014).

Los compuestos bioactivos del ajo brindan diversas propiedades biológicas que permiten aumentar la resistencia de los peces a las enfermedades en la acuicultura. En la piscicultura, el ajo presenta actividades antibacterianas, antiparasitarias, antioxidantes, inmunoestimuladoras y promotoras del crecimiento (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013, Lee y Gao, 2012); sin embargo, su uso es principalmente a nivel experimental.

### 2.4.1. Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana es el resultado de la modificación de la biosíntesis de lípidos y la síntesis de ARN en bacterias, inhibiendo tanto las bacterias gram-positivas como las gram-

negativas (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013). La actividad antibacteriana del ajo conferida por la alicina ha demostrado la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (Li *et al.*, 2011) y bacterias gram-negativas como *Escherichia coli* y *Aeromonas salmonicida* (Nya *et al.*, 2010, Oosthuizen *et al.*, 2018). La alicina es un compuesto que contiene azufre y una molécula de enfriamiento de detección de quórum reconocida que inhibe procesos como la formación de biopelículas y la virulencia (Bayan *et al.*, 2014, Jakobsen *et al.*, 2012). Musa y colaboradores (2008), estudiaron la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos acuosos de ajo (500, 250, 125, 62.5 mg mL<sup>-1</sup>) para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* (gram-positivos), *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* (gram-negativos) y *Edwardsiella tarda*. Los resultados revelaron que todos los extractos de ajo fueron efectivos contra las bacterias patógenas probadas.

La actividad contra las bacterias patógenas se manifiesta por las mayores tasas de supervivencia de diversos peces infectados cuando se utilizan extractos de ajo como ingredientes dietéticos. Por ejemplo, Nya y Austin (2009), probaron dietas agregadas con diferentes concentraciones de ajo para la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada con *Aeromonas hydrophila*, el experimento duró 14 días y reveló una reducción en la mortalidad de al menos 4% en comparación con los controles (88%). Thanikachalam y colaboradores (2010) evaluaron el uso de cáscara de ajo (*A. sativum*) en bagre africano infectado (*Clarias gariepinus*) con *A. hydrophila*; se incorporó cáscara de ajo en polvo a las dietas (0%, 0.5%, 1.0% y 1.5%) y se alimentó a los alevines de bagre durante 20 días; los resultados revelaron mayores tasas de supervivencia en los peces alimentados con cualquiera de las concentraciones de ajo en comparación con el grupo de control. Además, Talpur e Ikhwanuddin (2012), evaluaron la resistencia de la lubina asiática (*Lates calcarifer*) a la infección por *V. harveyi* cuando se alimenta con dietas que contienen ajo (*A. sativum*); en este caso las dietas suplementadas con ajo favorecieron la supervivencia de todos los grupos de consumidores, particularmente en aquellos que consumieron 10 g kg<sup>-1</sup> de alimento, que registraron una supervivencia del 83.4%, mientras que en el control fue del 33.3%.

Guo y colaboradores (2015), evaluaron la actividad antibacteriana del ajo contra los patógenos *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Streptococcus iniae* en cobia (*Rachycentron canadum*). Los peces fueron infectados experimentalmente con *P. damsela* subsp. *piscicida* o *S. iniae* y alimentados con dietas adicionadas con ajo en polvo (0.5 y 1.5 o 0.4 y 1.2 g kg<sup>-1</sup> de peso

corporal, respectivamente) durante 28 días. Los resultados demostraron que la adición de ajo disminuyó la mortalidad de los peces infectados y proporcionó una resistencia significativa contra el patógeno.

Breyer y colaboradores (2015), probaron dietas que contenían 0, 0.5, 1.0 y 2.0% de extracto de ajo durante 28 días en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas con *Aeromonas salmonicida*. Se registraron aumentos significativos en la supervivencia en truchas que consumieron 0.5 y 1.0% de extracto de ajo. Además, Eirna-liza y colaboradores (2016), investigaron los efectos de la inclusión de cáscaras de ajo y clavo de olor (*A. sativum*) sobre la resistencia de los alevines de bagre africano (*C. gariepinus*) frente a la infección por *Aeromonas hydrophila*. Los peces fueron alimentados durante 12 semanas con siete dietas experimentales que contenían niveles graduales de ajo (cáscara y dientes) a 0, 10, 20 y 30 g.kg<sup>-1</sup>, registrándose la supervivencia más baja (13%) en los peces que no consumían el ajo en comparación con todos los tratamientos (> 35%), mientras que la mayor supervivencia (64%) se observó en peces alimentados con dietas adicionadas con dientes de ajo a 20 g.kg<sup>-1</sup>. Finalmente, Foysal y colaboradores (2019), evaluaron el control de la infección por *Streptococcus iniae* en tilapia (*Oreochromis niloticus*) utilizando suplementos de ajo (*A. sativum*), documentando que el consumo de 1.0 g de ajo en polvo por 100 g de alimento durante dos semanas mejoró las tasas de supervivencia de los peces.

#### **2.4.2. Actividad Antioxidante**

Los fenoles y las saponinas del ajo son compuestos que proporcionan actividad antioxidante. Dichos compuestos pueden inhibir la formación de radicales libres y reforzar el mecanismo de captación de radicales endógenos, aumentar las enzimas antioxidantes celulares como el superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y hemooxigenasa-1 (HO-1). Además, la subunidad modificadora glutamato-cisteína ligasa (GCLM) protege a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación causada por radicales libres (González Maza *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2018). Asimismo, el uso de ajo como complemento alimenticio también puede mejorar el sistema antioxidante del pescado. Por ejemplo, Metwally (2009), probó el efecto del ajo sobre los diversos antioxidantes presentes en la tilapia del Nilo (*O. niloticus*); durante tres meses cuatro grupos de

peces fueron alimentados con dietas que contenían diferentes fuentes de ajo: ajo natural (una dieta de 40 g kg<sup>-1</sup>), cápsulas de aceite de ajo (Strongus®, cápsulas de aceite de ajo puro; dieta de 250 mg kg<sup>-1</sup>), tabletas de ajo en polvo (32 g kg<sup>-1</sup>dieta), y un grupo control sin ajo. Los resultados revelaron actividades mejoradas del glutatión peroxidasa (Gper), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en el pescado que consume cualquiera de los productos a base de ajo.

Mohebbi y colaboradores (2012), analizaron el efecto antioxidante del ajo dietético en la trucha arcoíris (*O. mykiss*). Los alevines de trucha se alimentaron con dietas que contenían 10, 20, 30, 40 y 50 g de ajo en polvo por kg de alimento formulado. Se midieron los peróxidos de lípidos en suero y las actividades de las enzimas antioxidantes, revelando que el consumo de ajo resultó en una disminución significativa de la peroxidación de lípidos, así como reducciones sustanciales en la actividad de la catalasa. Por el contrario, los niveles séricos de alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y superóxido dismutasa aumentaron en todos los grupos tratados con ajo en comparación con el control. Además, Altinterim y Aksu (2020), evaluaron las actividades antioxidantes de la catalasa (CAT), el glutatión reductasa (GR), el glutatión peroxidasa (GPx) y el malondialdehído (MDA) en el suero de la trucha arcoíris (*O. mykiss*). Los peces fueron alimentados con dietas que contenían ajo (*A. sativum*), ajo Tunceli (*Allium tuncelianum*) y aceite de cebolla (*Allium cepa*) a una concentración de 10 g kg<sup>-1</sup> durante 21 días; al final del bioensayo, la actividad GPx del grupo de aceite de ajo macerado y las actividades CAT, GR y MDA del grupo de cebolla registraron incrementos significativos.

### **2.4.3. Actividad Antiviral**

En comparación con los estudios sobre la actividad antibacteriana del ajo, los enfoques relacionados con la actividad antiviral son escasos. Sin embargo, existe evidencia de esta actividad en vertebrados; por tanto, se esperaría un efecto similar contra algunos virus que afectan a los vertebrados acuáticos. Karimi-Pashaki y colaboradores (2020), evaluaron la influencia del extracto de ajo (*A. sativum*) en la tasa de supervivencia de la carpa común (*Cyprinus carpio*) después de la exposición a la viremia primaveral del virus de la carpa (SVC). Los peces fueron alimentados con 1 y 5 g de extracto de ajo kg<sup>-1</sup> de la dieta basal durante ocho semanas. Los resultados mostraron

que la tasa de supervivencia de las carpas alimentadas con ambas concentraciones de extracto de ajo tuvo un aumento significativo en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$ ), especialmente la dieta que contenía 5 g de extracto de ajo. Sin embargo, se requiere investigación sobre la capacidad antiviral de los extractos de ajo y los mecanismos involucrados.

#### **2.4.4. Actividad Antiparasitaria**

La presencia de parásitos en la acuicultura de peces es un problema recurrente que afecta la producción. Abd El-Galil y Aboelhadid (2012), expusieron a la tilapia (*O. niloticus*) infestada con *Trichodina* y *Gyrodactylus* a baños de inmersión en aceite de ajo. En este estudio utilizaron cinco grupos de tilapias que fueron expuestas a baños con aceite de ajo (1, 1.5, 2, 2.5 y 3 ppt) y un grupo de control (0% de aceite de ajo) durante 24 horas. Los resultados revelaron que la tilapia registró tasas de recuperación  $\geq 55\%$  cuando se expuso al tratamiento con aceite de ajo.

Militz y colaboradores (2014), infectaron el pez barramundi (*L. calcarifer*) con *Neobenedenia* sp. y expusieron a los organismos a un baño terapéutico de extracto de ajo usando cuatro concentraciones (1, 2, 10 y 20 mL L<sup>-1</sup>) y un control (agua dulce con formalina). Los extractos de ajo impidieron significativamente la eclosión de los huevos (solo el 5% eclosionaron) y la longevidad de las larvas (<2 h), contrastando con el alto porcentaje de eclosión en el control (95%). Las bajas concentraciones de extracto de ajo (1 y 2 mL L<sup>-1</sup>) disminuyeron el éxito de infección de *Neobenedenia* sp. hasta el 25 y el 11%, respectivamente. En otro enfoque con el pez guppy (*Poecilia reticulata*), Fridman y colaboradores (2014), expusieron peces infectados con *Gyrodactylus turnbulli* a baños terapéuticos con extractos de ajo (7.5 a 30 mL L<sup>-1</sup>), y alimentaron a otros peces infectados (*G. turnbulli* y *Dactylogyrus*) con dietas formuladas que contenían ajo en polvo (10 y 20 %) durante 14 días. Los resultados de este enfoque revelaron que la exposición de los peces a los baños de ajo provocó la expulsión de los parásitos, y se observó una correlación positiva entre la concentración de ajo y el tiempo requerido para que los parásitos se desprendieran y murieran. En particular, la concentración más alta (30 mL L<sup>-1</sup>) resultó en un tiempo promedio de desprendimiento de 4.1 minutos y un tiempo promedio de muerte de 8.6 minutos. Para los grupos de peces alimentados con dietas que contienen ajo, se observó una menor prevalencia e intensidad

de parásitos en comparación con el control. Saha y Bandyopadhyay (2017), expusieron el pez dorado (*Carassius auratus*) infectado con Trichodiniasis con tres géneros de parásitos tricodinidos: *Trichodina*, *Tripartiella* y *Trichodinella* a baños terapéuticos con diferentes concentraciones de extracto de ajo (5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg L<sup>-1</sup>), demostrando que 15 mg L<sup>-1</sup> de extracto de ajo fue más eficaz para la reducción de los parásitos tricodinidos destacando la actividad antiprotozoaria del ajo.

Armuelles-Bernal y colaboradores (2022) llevaron a cabo una evaluación del efecto antihelmíntico de baños de inmersión que contenían extracto de ajo (EA) y dialil sulfuro (DAS) en diferentes etapas de vida de *Zeuxapta seriolae*, tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*. En el análisis *in vitro*, se notó una reducción en el éxito de eclosión de los huevos cuando se exponían agudamente a 16 mL de extracto de ajo por litro (EA/L) y 0.01 mg de dialil sulfuro por mililitro (DAS/mL), así como cuando se exponían de manera continua a 4 mL de EA/L y 0.01 mg de DAS/mL. Además, se registró una disminución significativa en la esperanza de vida de los oncomiracidios cuando se exponían a 1 mL de EA/L y 0.01 mg de DAS/mL. Por último, los adultos mostraron un desprendimiento de los filamentos branquiales después de 2.5 horas y un tiempo de supervivencia reducido cuando se exponían a 4 mL de EA/L. En los ensayos *in vivo*, se observó una disminución significativa en la intensidad media de los parásitos con 4 mL de EA/L y 0.01 mg de DAS/mL. Sin embargo, concentraciones más altas tanto de extracto de ajo como de dialil sulfuro tuvieron efectos adversos en los peces, lo que impidió la finalización exitosa del tratamiento.

#### **2.4.5. Actividad Inmunoestimulante**

El efecto inmunizante del ajo se ha utilizado en la trucha arcoíris, la tilapia híbrida y la lubina asiática. Los estudios han documentado aumentos en las respuestas celulares, como la actividad fagocítica, y la respuesta humoral, incluyendo el aumento de proteínas totales, lisozimas, anti-proteasas y actividad bactericida. Estos efectos beneficiosos se han observado cuando se utiliza ajo crudo y también cuando se añaden extractos de ajo como aditivos en los alimentos formulados (Ndong y Fall, 2011, Nya y Austin, 2009, Talpur y Ikhwanuddin, 2012). En el pez guppy (*P. reticulata*), la administración de extracto de ajo en los alimentos aumentó los parámetros

inmunológicos en el moco cutáneo, que es la primera barrera frente a los patógenos (Ahmadniaye Motlagh *et al.*, 2020).

#### **2.4.6. Promotor de Crecimiento**

La inclusión de ajo en la alimentación de los peces también puede influir en el crecimiento debido a compuestos organosulfurados como la alicina, que es un potente estimulante del "olor" o quimiorrecepción de la mayoría de los animales acuáticos, lo que aumenta la ingesta de alimentos en peces (Lee y Gao, 2012).

El efecto sobre el crecimiento de la incorporación de ajo en los alimentos se ha probado en diferentes especies acuáticas. Aly y Atti (2008), alimentaron tilapia (*O. niloticus*) con una dieta suplementada con ajo (dieta de 10 y 20 g kg<sup>-1</sup>) durante dos meses e informaron aumentos en la tasa de supervivencia, en el rendimiento del crecimiento y una mejora en el estado de salud. Thanikachalam y colaboradores (2010), alimentaron a alevines de bagre (*C. gariepinus*) con dietas que contenían diferentes concentraciones de polvo de cáscara de ajo (0%, 0.5%, 1.0% y 1.5%) durante 20 días, reportando mayores tasas de supervivencia en todos los grupos que consumían cáscara de ajo. Manoppo y colaboradores (2016), utilizaron dietas con gránulos que contenían ajo como ingrediente para la alimentación de la carpa común (*C. carpio*) durante un mes, documentando un efecto significativo en el crecimiento en comparación con el control sin ajo. Finalmente, Etyemez-Büyükdeveci y colaboradores (2018), estudiaron el impacto del uso de dietas con extracto de ajo para alimentar a la trucha arcoíris (*O. mykiss*), encontrando que el aumento de peso y la tasa de crecimiento específico de los peces mejoraron significativamente cuando los peces consumieron las dietas que contenían ajo. Se requiere generar más investigación que permita comprender los mecanismos que explican cómo el uso de ajo mejora el rendimiento del crecimiento en los peces. Una posible hipótesis planteada es que el efecto protector del ajo contra enfermedades podría favorecer la bioenergética de los peces. Esto significa que, al protegerse de las enfermedades, los peces gastarían menos energía en combatir patógenos y podrían destinar más energía al crecimiento somático.

### 2.4.7. Modulación de la Microbiota Intestinal

El ajo, con sus diversas propiedades, ha despertado un gran interés en la acuicultura debido a su potencial para influir en la salud y el bienestar de los peces. Entre sus propiedades se encuentran efectos antibacterianos, antifúngicos y antioxidantes, los cuales pueden contribuir a la prevención y el tratamiento de enfermedades en los peces. Sin embargo, es importante destacar que el consumo de ajo también puede tener efectos en la microbiota intestinal de los peces. La microbiota intestinal desempeña un papel crucial en la digestión, la inmunidad y el equilibrio de la salud intestinal de los peces. El ajo se ha asociado con modificaciones beneficiosas en la composición de la microbiota intestinal; sin embargo, la información sobre este tema aun es limitada.

Etyemez-Büyükdeveci y colaboradores (2018), trabajaron con trucha arcoíris (*O. mykiss*) alimentada con diferentes concentraciones de ajo: 0% (control), 1% (Grupo 1), 1.5% (Grupo 2) y 2% (Grupo 3) por 120 días. Los resultados mostraron que la abundancia y riqueza de especies en los tratamientos fueron diferentes en el grupo control y el grupo 3; mientras que los índices fueron disminuyendo a medida que la concentración de ajo aumentaba. Los autores concluyeron que la suplementación dietética de ajo modificó la composición de la comunidad bacteriana, modificando la diversidad y riqueza de microorganismos, dando como resultado comunidades distintas dentro del ecosistema intestinal de los peces.

Torrecillas y colaboradores (2019), probaron el efecto de dietas fitogénicas (extracto de ajo y *labiatae*) y oligosacáridos en la microbiota intestinal de lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) pre y post infección por *Vibrio anguillarum*, combinada con estrés por hacinamiento. Se demostró que después de la inoculación intestinal bacteriana, el intestino posterior de los peces alimentados con el aceite de ajo y *labiatae*, respondió de una manera más controlada y tardía en términos de tamaño de células caliciformes y cobertura de mucus, en comparación con otros tratamientos.

Foysal y colaboradores (2019), realizaron un estudio para caracterizar el agente de la estreptococosis en tilapia (*O. niloticus*) y el control de la infección por estreptococos por medio de suplementos de ajo. El resultado mostró que el extracto de ajo fue más efectivo contra la infección por *Streptococcus*, además de mejorar significativamente las tasas de supervivencia de los peces contra las infecciones por *S. iniae*, moduló la comunidad microbiana y el perfil de expresión de genes de citocinas, en el intestino de la tilapia. Los tratamientos con ajo mejoraron



significativamente la tasa de supervivencia y la abundancia para los filos Proteobacterias y Tenericutes, filos asociados con la flora intestinal saludable y aumento en el índice de diversidad bacteriana. Por lo anterior, se concluyó que la suplementación dietética con ajo, podría ser eficaz en la prevención de la infección por *S. iniae* en peces.

Se han realizado algunos estudios sobre el efecto de los inmunoestimulantes como potenciadores de crecimiento, desarrollo del organismo estimulante del sistema inmune y su beneficio a la microbiota benéfica intestinal en peces de cultivo. Sin embargo, aún no se ha estudiado a detalle el efecto de estimulantes como la planta de ajo en la estructura y perfil funcional de la microbiota intestinal de peces, en específico en el jurel de cola amarilla (*S. dorsalis*), el cual se ha convertido en una especie con potencial acuícola.

## 2.5. . Estudio de la Microbiota Intestinal de Jurel Cola Amarilla (*Seriola dorsalis*)

La microbiota intestinal de peces ha sido ampliamente estudiada, debido a su importante papel en la nutrición y salud de su hospedero (Ganguly y Prasad, 2012, Pérez *et al.*, 2010, Ray *et al.*, 2012, Tran *et al.*, 2017). Específicamente en el intestino, se encuentra una gran diversidad de microorganismos tanto benignos como patógenos (Nayak, 2010, Pérez *et al.*, 2010), que desempeñan funciones en procesos biológicos importantes para su hospedero. Por ejemplo, la síntesis de vitaminas, enzimas, producción de sustancias antimicrobianas, estimulación del sistema inmunitario (Nayak, 2010, Ray *et al.*, 2012, Tran *et al.*, 2017), intervienen en procesos de digestión y absorción de nutrientes, e incluso fomentando el crecimiento y diferenciación celular (Sorroza, 2012, Mosquera Rentería *et al.*, 2015). Se considera que la microbiota es específica en peces y se vuelve estable en la etapa adulta; para peces de agua dulce, los grupos más representativos en el tracto digestivo son los géneros *Aeromonas*, *Pleisomonas*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*, mientras que en los peces marinos los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* son los más representativos (Cahill, 1990, Aguilera *et al.*, 2013).

En cuanto al jurel, se han realizado estudios sobre la composición de su microbiota intestinal en diferentes etapas de desarrollo y ambientes. Un estudio realizado por Aguilera y colaboradores (2013), evaluó la composición microbiana intestinal en dos etapas de desarrollo del jurel (juvenil

(33 días) y pre-adulto (95 días). En la etapa juvenil los filos predominantes fueron Proteobacteria, Actinobacteria y Bacilli, mientras que los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Staphylococcus*. En la etapa de pre-adulto el filo más abundante fue Actinobacteria, seguido de Proteobacteria y Bacilli y los géneros *Francisella*, *Microbacterium*, *Bacillus* y *Vibrio*. En otro estudio realizado por Rubio y colaboradores (2016), se determinó que los filos más representativos en la microbiota intestinal de jurel adulto en medio silvestre fueron Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes así como los géneros *Leucobacter*, *Alcaligenes*, *Marinobacter* y *Psychrobacter*.

Estos estudios confirmaron que la alimentación artificial reduce significativamente la diversidad de la microbiota intestinal en peces de cultivo (Dhanasiri *et al.*, 2011) y que los filos predominantes en jurel de cultivo y silvestre fueron Proteobacteria y Actinobacteria, los cuales predominan en la microbiota intestinal de peces marinos, sugiriendo que estas bacterias están adaptadas a las condiciones del intestino y del medio circundante (Tapia-Paniagua *et al.*, 2010, Xing *et al.*, 2013). A pesar de tener un panorama general de la composición de la microbiota intestinal de jurel, existen pocos estudios acerca de las funciones que esta desempeña en el desarrollo y salud del organismo. Uno de los estudios más recientes acerca de la composición y potencial funcional de la microbiota intestinal de jurel cultivado y silvestre fue el realizado por Ramírez y Romero (2017). Un total de 13 géneros fueron representados diferencialmente entre los dos grupos, los cuales se han descrito como microorganismos benéficos para su hospedero y los perfiles más representativos de la microbiota fueron el metabolismo de cofactores y vitaminas, aminoácidos y carbohidratos, encontrando diferencias en la contribución de la microbiota según el origen de los peces.

También se ha estudiado el efecto de diversas materias para la formulación de alimentos en la microbiota intestinal en jurel. Dam y colaboradores (2020), estudiaron los efectos de materias primas de alimentos alternativos en las comunidades bacterianas en la zona distal de intestino y su relación con la digestibilidad de nutrientes en el jurel de cola amarilla (*S. dorsalis*); se realizaron dos ensayos de digestibilidad de cuatro semanas para evaluar la harina de pescado, harina de subproductos de aves de corral, harina de sangre, harina de habas, harina de gluten de maíz, concentrado de proteína de soja y harina de trigo. Como resultado, el filo más abundante fue Proteobacteria. Los peces alimentados con dietas que contenían gluten de maíz y harina de sangre mostraron una reducción de la riqueza de especies en intestino distal. Además, los filos *Allivibrio*, *Vibrio*, *Curvibacter*, *Ruminococcaceae* y *Clostridium* fueron correlacionados positivamente,

mientras que el género *Ralstonia* se correlacionó negativamente con la digestibilidad de los nutrientes, demostrando así, que la microbiota intestinal puede variar dependiendo de la composición de la dieta en peces y que esta puede ser una herramienta útil para evaluar la digestibilidad de ingredientes para alimento.

Por otro lado, Ramírez y colaboradores (2020), evaluaron las propiedades probióticas *in vitro* de bacterias aisladas del contenido intestinal de *Seriola lalandi* silvestre. Encontraron que 19 aislamientos identificados como *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter* y *Acinetobacter* mostraron actividad antimicrobiana contra *Vibrio* y estimularon genes relacionados con la respuesta inmune en peces como la expresión relativa significativa de citocinas, proteína amiloide A sérica (SAA), hepcidina y lisozima. Por lo que, estos géneros podrían ser considerados como probióticos potenciales en el cultivo de jurel cola amarilla (*S. dorsalis*).

La colonización y desarrollo de la microbiota en peces están determinados por el contacto con el ambiente, la composición de la dieta, la absorción de nutrientes, etapa de crecimiento, la presencia de proteínas y enzimas digestivas, entre otras (Escobar-Briones *et al.*, 2006, Sorroza, 2012). La modulación de la composición y metabolismo de la microbiota intestinal a través de la suplementación de sustancias naturales como el ajo en la dieta, se presenta como una estrategia para mejorar los mecanismos de defensa del sistema inmune de los organismos, aumentando la resistencia a enfermedades. Además, las sustancias naturales son amigables con el ambiente, por lo que pueden sustituir a los antibióticos como medida de control de enfermedades sin afectar la salud humana (Bulfon *et al.*, 2015).

### **3. HIPÓTESIS**

La adición de ajo al alimento del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) modifica la composición y funcionalidad de su microbiota intestinal, propiciando la proliferación de bacterias benéficas para el organismo.

## **4. OBJETIVOS**

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la administración de alimento adicionado con polvo de ajo en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de jurel cola amarilla (*S. dorsalis*).

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Analizar la diversidad taxonómica de la microbiota intestinal del jurel alimentado con dietas adicionadas con polvo de ajo.
2. Predecir el perfil funcional de la microbiota intestinal del jurel alimentado con dietas adicionadas con polvo de ajo.
3. Comparar la composición microbiana y perfil funcional de la microbiota intestinal de jurel alimentado con dietas adicionadas con polvo de ajo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Bioensayo

El bioensayo que incluye: la elaboración de las dietas, cultivo de organismos, diseño experimental y colección de muestra se realizaron por la Dra. Candy Elizabeth Armuelles Bernal como parte de su tesis de Doctorado, bajo la dirección de la Dra. Mónica Hernández Rodríguez y el Dr. Benjamín Barón Sevilla, investigadores del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

En esta sección se describe brevemente el diseño experimental de la investigación realizada por la Dra. Armuelles, de la cual se proporcionaron las muestras de intestino para la realización del presente estudio.

#### 5.1.1. Dietas

En la elaboración de las dietas se utilizó el alimento comercial Marine MX (Skretting) con 46% de proteína y 11% de lípidos. El alimento se trituró en una licuadora hasta alcanzar un tamaño de partícula de 1 mm, posteriormente, se incorporaron las diferentes concentraciones de ajo en polvo (4, 10 y 25%) más 5% de almidón y agua destilada, empleando una mezcladora industrial Hobart® Legacy. La mezcla se pasó tres veces por un molino (Hobart® Legacy) con una placa con perforaciones de 4 mm, y las pelet de alimento se colocaron en charolas de aluminio y se secaron en una estufa Thermolyne (Oven serie 9000) por 22 h a 48°C. La dieta control se sometió al mismo procedimiento de repeletizado pero sin polvo de ajo. Finalmente, el alimento se almacenó a una temperatura de 4°C hasta su utilización (Armuelles-Bernal *et al.*, 2022).

### 5.1.2. Diseño Experimental

El cultivo de peces juveniles (5 g aprox.) que fueron donados por la empresa Ocean Baja Labs S. A. de C. V., se hizo en el laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura. Los jureles fueron mantenidos en tanques de 7 m<sup>3</sup> acoplados a un sistema de recirculación y se alimentaron con la dieta Marine MX (Skretting), hasta su utilización. Para el bioensayo, peces con un peso de 168±5.5 g, se trasladaron al laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura y se colocaron en 12 tanques de 460 L. Cada tanque contaba con sistema de aireación y temperatura controlada con un calentador de titanio acoplado a una caja reguladora de la temperatura y un sensor de nivel. Se colocaron 20 peces libres de parásitos en cada uno de los tanques, distribuidos en cuatro grupos experimentales con tres repeticiones cada uno. Antes de iniciar el experimento, los peces se aclimataron por 15 días, de la siguiente manera: se mantuvieron a 20 °C durante una semana y posteriormente la temperatura se aumentó 1°C cada dos días, hasta llegar a 25°C (Rodríguez-Fonseca, 2014). Se realizaron recambios continuos de agua (600% del volumen diario) y los peces fueron alimentados con una ración equivalente al 3.5% de su biomasa con el alimento Marine MX (Skretting) dividido en dos raciones diarias (Orellana *et al.*, 2014).

Una vez aclimatados, se tomaron las muestras iniciales para el análisis de la microbiota intestinal y los peces fueron alimentados con una de las cuatro dietas (0, 4, 10 y 25% de polvo de ajo) durante 30 días, manteniendo las condiciones de cultivo. Al término, los peces se mantuvieron sin alimentación por 24 h y se colectaron cinco peces de cada tanque para el análisis de la microbiota intestinal.

### 5.1.3. Colección de Muestra

Para la recolección de muestras de intestinos, los peces fueron sacrificados siguiendo el protocolo propuesto por AVMA (American Veterinary Medical Association) (Leary *et al.*, 2013). Primeramente, cada organismo se anestesió con triclaína (100 mg/L) hasta observar la disminución del reflejo de huida y pérdida del equilibrio. Posteriormente, se procedió a se realizó la transección

cervical y punción medular (Armuelles-Bernal *et al.*, 2022).

El intestino fue disectado y las secciones anterior o proximal y posterior o distal se colocaron por separado en una hoja de aluminio previamente limpiado con una gaza impregnada de alcohol y etiquetado. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su análisis.

## 5.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN de cada una de las muestras se llevó a cabo utilizando el kit comercial de extracción FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) y se determinó la concentración del ADN en el fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen), utilizando el kit Qubit® (Thermo Fisher Scientific™). Posteriormente, se realizó un procedimiento de limpieza y concentración para las muestras de ADN que mostraron posible contaminación con proteínas empleando el protocolo del kit GeneClean II (MPBiomedicals). Una vez determinada la concentración de ADN en las muestras, se procedió al proceso de amplificación.

## 5.3. Creación y Normalización de Librerías para Secuenciación

La amplificación de la región variable 4 de la subunidad 16S del gen del ARN ribosomal (ARNr) se realizó por el método de doble indexado de Kozich y colaboradores (2013), en donde la amplificación y la unión de los adaptadores se llevan a cabo en una sola reacción PCR. Se usaron iniciadores que contienen los adaptadores para la plataforma de secuenciación, los índices, secuencias de unión (PAD-linker) y los iniciadores específicos para la región de interés. Los iniciadores específicos para el gen 16S fueron los propuestos por Caporaso y colaboradores (2011), 515F (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3') y 806R (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3'). El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 ° C durante 2 min, 38 ciclos de desnaturalización a 95 ° C durante 20 s, alineamiento a 55 ° C durante 15 s y extensión 72 ° C



durante 2 min, con una extensión final a 72 ° C por 7 min. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar si hay productos. Los productos esperados presentaron un tamaño aproximado de 400 pb. Con la finalidad de obtener suficiente cantidad de producto, las muestras se amplificaron por triplicado y se realizó un pool por cada una.

Para llevar a todas las muestras a una misma concentración, se realizó una normalización de los amplicones con el kit de normalización en placa SequalPrep™ (96) (Applied Biosystems™) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se cuantificó la concentración de las bibliotecas utilizando el fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen) y el kit Qubit® (Thermo Fisher Scientific™).

Finalmente, la secuenciación paired-end de las muestras se realizó en la plataforma Mi-Seq (Illumina) en las instalaciones del Laboratorio de Metagenómica del CICESE, utilizando el MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles) MiSeq (2x250 pb). Todas las lecturas de extremos emparejados sin procesar se han depositado en la base de datos del archivo de lectura de secuencias (SRA) en NCBI con el ID de BioProyecto SUB12872821.

## 5.4. Análisis Bioinformático

### 5.4.1. Análisis de Calidad y Asignación Taxonómica

Las lecturas de secuenciación obtenidas fueron evaluadas mediante el pipeline del programa QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology v 2019.4-2019.7) (Bolyen, 2019). Las secuencias se filtraron por calidad y se eliminaron aquellas secuencias que tuvieran un valor de calidad menor a 25. Las secuencias filtradas se ensamblaron por pares (Forward y Reverse) y las posibles quimeras fueron eliminadas usando DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Los parámetros de filtrado utilizados para recortar y truncar con DADA2 fueron 1/136 y 1/112, respectivamente. Posteriormente, las secuencias se agruparon en variantes de secuencia de amplicon (ASV: amplicon sequence variant) con un nivel de identidad del 100% usando DADA2 contra la base de datos SILVA Versión 132.

Las asignaciones taxonómicas de los ASVs se llevaron a cabo mediante clasificación-consenso-blast (Camacho, 2009), formando agrupaciones del gen 16S ARNr agrupadas en un 100% de similitudes dentro de la base de datos SILVA\_132 (Quast *et al.*, 2012). Los ASVs se alinearon y filtraron con MAFFT v.7 (Kato y Standley, 2013), y se construyó un árbol filogenético y se enraizó con fastTree v.2.1 (Price, 2010). Las secuencias sin coincidencias en la base de datos SILVA\_132 fueron eliminadas. Como un paso adicional se eliminaron el 0.0005% de las lecturas, correspondientes a los ASVs muy poco abundantes (Bokulich *et al.*, 2013).

#### **5.4.2 Análisis de Diversidad**

Utilizando la suite QIIME2 (Bolyen, 2019), se determinó la diversidad microbiana de cada muestra (alfa diversidad) y entre las muestras (beta diversidad), se realizaron gráficas de abundancia relativa, curva de rarefacción y gráficas de coordenadas principales. Se emplearon los índices de diversidad alfa: Shannon (diversidad), Chao1 (riqueza bacteriana) y Simpson (abundancia relativa). Para observar similitudes en la composición de la comunidad microbiana en los diferentes tratamientos, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la métrica de distancia filogenética ponderada UniFrac, que considera la abundancia de los ASVs (cuantitativo) en los diferentes tratamientos (Lozupone *et al.*, 2011). Los resultados fueron visualizados con EMPERor (Vázquez-Baeza *et al.*, 2013). Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) a  $p < 0.05$  utilizando QIIME2.

#### **5.4.3 Análisis de Abundancia Diferencial (DA)**

Los análisis de ocurrencia y abundancia diferencial entre los distintos tratamientos y secciones del intestino se realizaron a nivel de familia; esto debido a que observamos que la mayoría de las características podían ser descritas de manera precisa a nivel de familia, ya que el 86% de las

características se encontraban en este nivel taxonómico. Estos análisis se realizaron en el programa RStudio con la paquetería phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013). En un principio, examinamos el conjunto de 219 familias que obtuvimos de la asignación taxonómica. Previo a la evaluación de la abundancia diferencial, empleamos un proceso de filtración no supervisada basado en la prevalencia de las características. Tras este paso de filtración, retuvimos un total de 70 familias (que representan el 96% de la abundancia total, con una abundancia absoluta de 68,660). Las familias cuya clasificación taxonómica no pudo ser determinada se etiquetaron con sus linajes incompletos.

Asumimos que las características (antes de los pasos de filtrado en el flujo de trabajo bioinformático, por ejemplo, eliminación de quiméricos, filtrado de lectura de calidad, características de filtrado bajo, etc.) representan una combinación de variantes biológicas reales que siguen estando insuficientemente documentadas debido a la falta de representantes en la base de datos (Hibbett y Glotzer, 2011). Un conjunto de 151 familias intersectadas en ambos tejidos; se encontró que 26 y 42 taxones eran exclusivos en tejido, intestino anterior o intestino medio, respectivamente. Las familias que aparecen solamente en un tejido se excluyeron de la prueba DA.

#### **5.4.4. Predicción Funcional**

Las predicciones del potencial funcional de diferentes ASV se realizaron en PICRUST 2 (v.2.1.4 beta) (Douglas *et al.*, 2019). Las predicciones funcionales se obtuvieron comparando el número de copias de 16S ARNr normalizado con la base de datos de la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Se calcularon los valores ponderados del índice de taxón secuenciado más cercano (NSTI, Nearest Sequenced Taxon Index) de cada ASV. Este valor mide la precisión de predicción de PICRUST 2 ya que muestra la distancia genética promedio entre cada ASV contra un genoma de referencia (Langille *et al.*, 2013, de Voogd *et al.*, 2015, Douglas *et al.*, 2019). Además, se eliminaron los ASV con valores NSTI superiores a 4 (Douglas *et al.*, 2019). Finalmente, para visualizar la diferencia funcional entre los grupos, se realizó un análisis discriminante lineal (LEfSe), efecto-tamaño (LDA) en funciones de nivel tres de vías KEGG y un mapa de calor en función de la abundancia de vías KEGG identificadas

mediante el programa MicrobiomAnalyst (Dhariwal *et al.*, 2017).

#### **5.4.5. Análisis de Redes de Interacción**

Se realizó un análisis de co-expresión no binaria utilizando un enfoque ponderado topológicamente (wTO) (Gysi *et al.*, 2018) para evaluar la fuerza de las interacciones entre las familias bacterianas detectadas en diferentes tejidos. Se enfocó especialmente en comparar el grupo control (dieta comercial) y el T3 (25% PA) en ambos tejidos, ya que se observó una mayor disbiosis o diferencia en la riqueza y diversidad de bacterias en este último grupo. El método de la wTO mide un umbral de enlace a enlace de valor p ajustado (p<sub>adj</sub>) significativo <0,05 (Gysi *et al.*, 2018).

Para observar detalladamente la interacción de las familias clase de bacterias se realizó un análisis de estimación dispersa de correlaciones entre microbiomas (SECOM) (Lin *et al.*, 2022) en el programa MicrobiomeAnalyst (Dhariwal *et al.*, 2017). Las correlaciones negativas (enlaces de color azul) suelen representar relaciones simbióticas o comensales; mientras que las correlaciones positivas (enlaces de color rojo) suelen representar interacciones depredador-presa, alelopatía o competencia por recursos limitados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Extracción y Amplificación de ADN

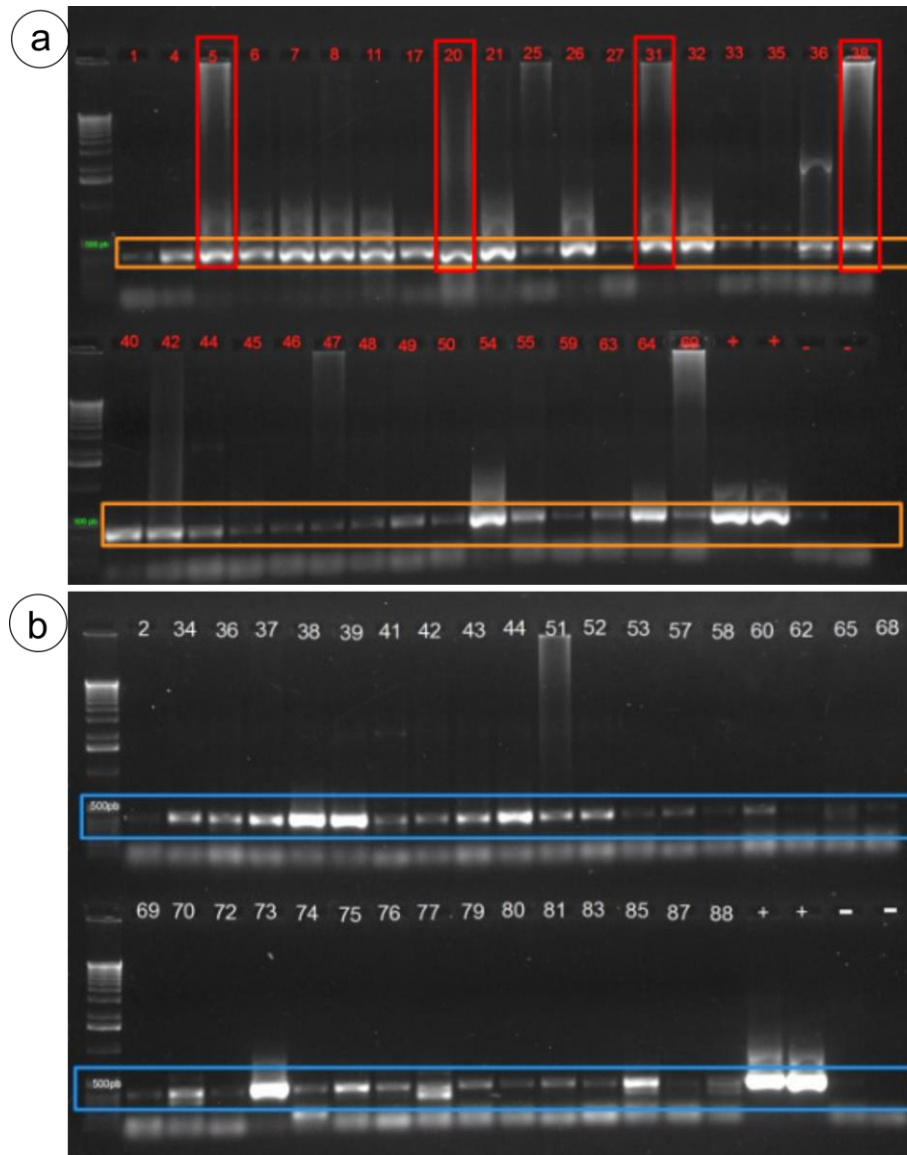
Se realizaron extracciones de ADN de un total de 50 muestras de intestino correspondientes a los dos segmentos de intestino y los cuatro grupos experimentales. Las muestras que presentaron problemas durante la extracción fueron limpiadas con el kit comercial GeneClean II (MP Biomedicals) y posteriormente se midió nuevamente su concentración. El promedio de concentración fue 30.92 ng/μL siendo la máxima concentración 173.4 ng/μL y la mínima de 1.4 ng/μL. Las muestras extraídas y la concentración de ADN (ng/μL) se muestran en el siguiente cuadro.

**Cuadro 2.** Concentración de ADN (ng/μL) en las muestras de intestino por tratamiento. PA: Polvo de ajo.

<b>Tratamiento</b>	<b>#</b>	<b>Muestra</b>	<b>ADN (ng/μl)</b>	<b>Intestino</b>
<b>4% de PA</b>	1	OP41IP	12.4	Posterior
	2	OP42IP	6.9	Posterior
	3	OP43IP	2.9	Posterior
	4	OP44IP	5.8	Posterior
	5	OP45IP	4.1	Posterior
	6	OP41IA	4.3	Anterior
	7	OP42IA	6.6	Anterior
	8	OP43IA	7.2	Anterior
	9	OP44IA	4.5	Anterior
	11	OP47IA	6.7	Anterior
	<b>10% de PA</b>	23	OP101IA	5.4
24		OP102IA	84.8	Anterior
25		OP103IA	15.1	Anterior
26		OP104IA	173.4	Anterior
27		OP105IA	4.8	Anterior
28		OP101IP	46.1	Posterior
29		OP102IP	43.8	Posterior
30		OP103IP	18.4	Posterior
31		OP104IP	39.9	Posterior
32		OP105IP	133.5	Posterior

<b>25% PA</b>	43	OP251IA	49.1	Anterior
	44	OP252IA	12.8	Anterior
	45	OP253IA	85.9	Anterior
	46	OP254IA	7	Anterior
	47	OP255IA	7.3	Anterior
	48	OP251IP	7.9	Posterior
	49	OP252IP	14	Posterior
	50	OP253IP	4.2	Posterior
	51	OP254IP	5.8	Posterior
	52	OP255IP	7.9	Posterior
<b>Control</b>	63	OPC2IA	59.3	Anterior
	64	OPC3IA	64	Anterior
	65	OPC5IA	6.2	Anterior
	66	OPC6IA	12.2	Anterior
	67	OPC7IA	7.7	Anterior
	68	OPC2IP	53	Posterior
	69	OPC3IP	7.5	Posterior
	70	OPC5IP	41.1	Posterior
	71	OPC6IP	22.6	Posterior
	72	OPC7IP	8.6	Posterior

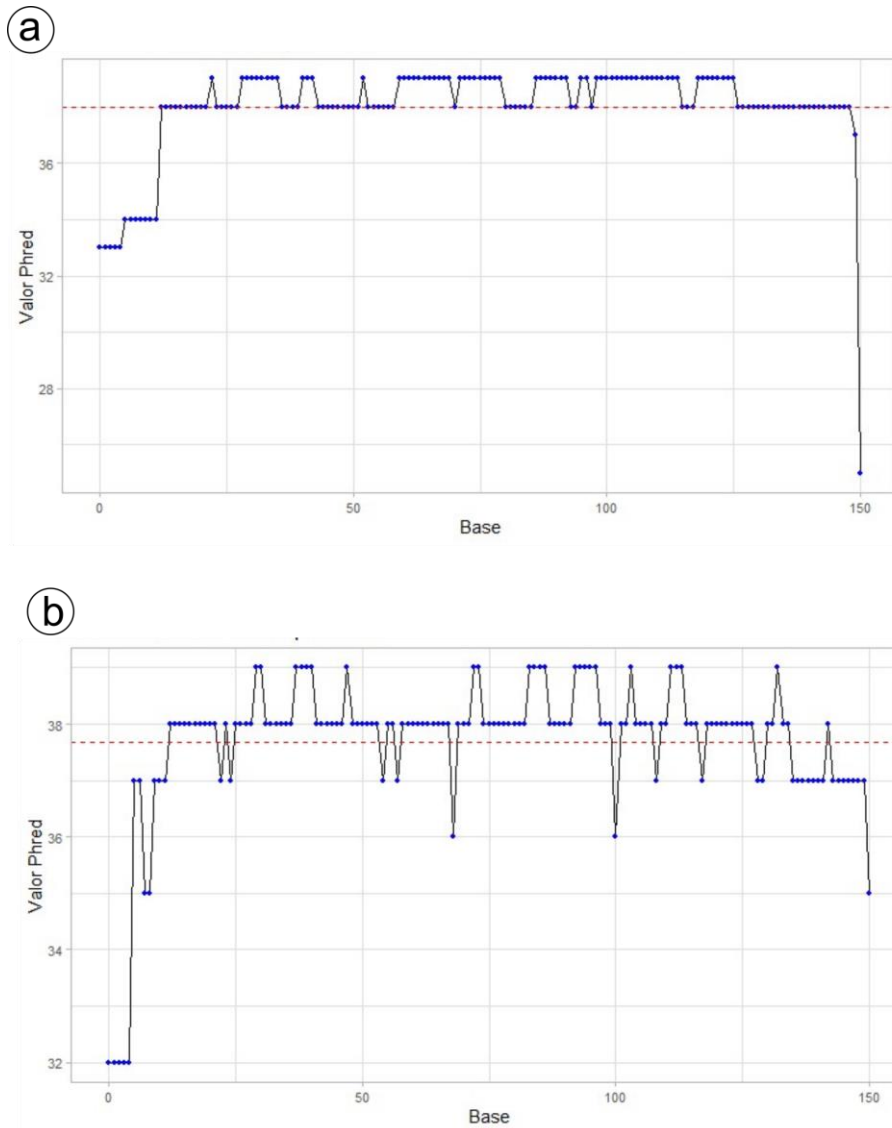
Para confirmar que la amplificación se realizó con éxito, se verificó mediante electroforesis de un gel de agarosa al 1%, confirmándose que la amplificación fue exitosa, ya que las bandas obtenidas presentaron el tamaño esperado (400-450pb). Al observar el gel se detectaron algunas bandas tenues pero definidas, lo que resultó aceptable dada las concentraciones de ADN variables obtenidas en la extracción. Sin embargo, se observó también un ligero barrido en algunas de las muestras, que podría indicar contaminación por proteínas, y en otras muestras no se observan bandas. Por tanto, se procedió a realizar una limpieza adicional de las muestras. En la siguiente imagen del gel se muestran algunas muestras ya con limpieza a simple vista se puede observar que el barrido disminuyó considerablemente (Figura 3).



**Figura 3.** Amplicones de la región V4 del gen 16S ARNr en gel de agarosa al 1%. a) Amplicones obtenidos sin limpieza. b) Amplicones obtenidos después del proceso de limpieza.

## 6.2. Control de Calidad de las Secuencias

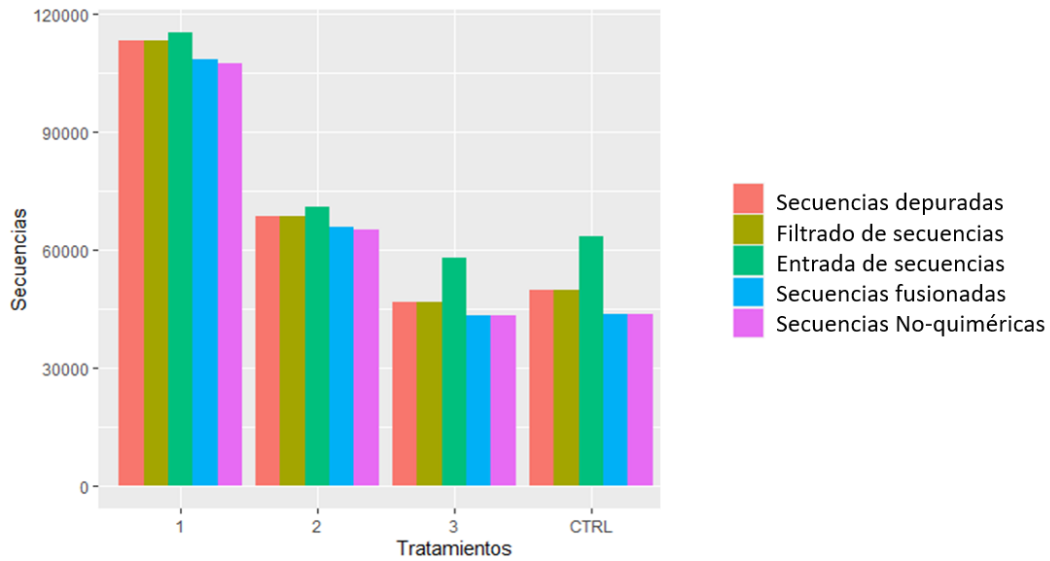
La secuenciación fue de buena calidad de las secuencias, con  $Q > 30$ , para la mayoría de las secuencias, como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Gráficas de calidad de secuencias. a) Secuencias sentido (forward). b) Secuencias anti-sentido (reverse).

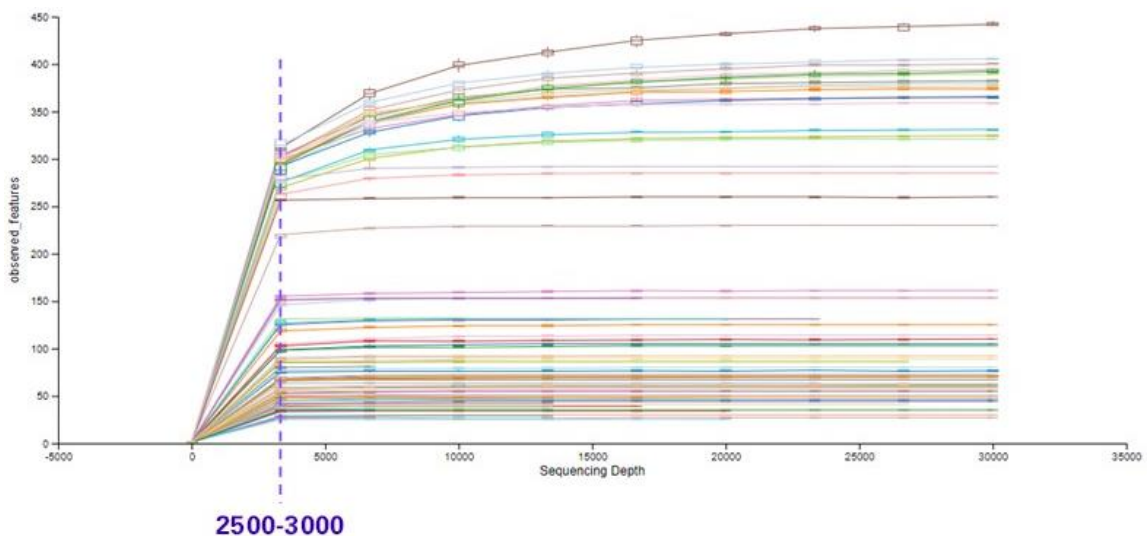
En total, se generaron 3,848,169 lecturas y la relación de las secuencias filtradas y las secuencias utilizadas en el análisis final se muestran en la figura 5. Después del control de calidad, permanecieron 3,028,037 secuencias (78,68%), lo que resulta 35,415 secuencias en promedio por muestra y permitieron en total la asignación de 4,504 ASV.





**Figura 5.** Control de calidad de las secuencias obtenidas y secuencias utilizadas para el análisis en QIIME2 (Bolyen, 2019).

Por otro lado, las curvas de rarefacción indican que la profundidad de secuenciación de todas las muestras fue suficiente para alcanzar el punto de meseta o inflexión, lo cual es indicativo que se ha secuenciado casi la totalidad de la diversidad bacteriana total presente en cada muestra. En general y para la mayoría de las muestras, a partir de las 2500 secuencias ya se había cubierto toda la diversidad presente en esa muestra (Figura 6).



**Figura 6.** Curva de rarefacción que muestra la secuenciación en cada una de las muestras. En el eje X se describe la profundidad de secuenciación por muestra y en el eje Y el número de ASV observados.

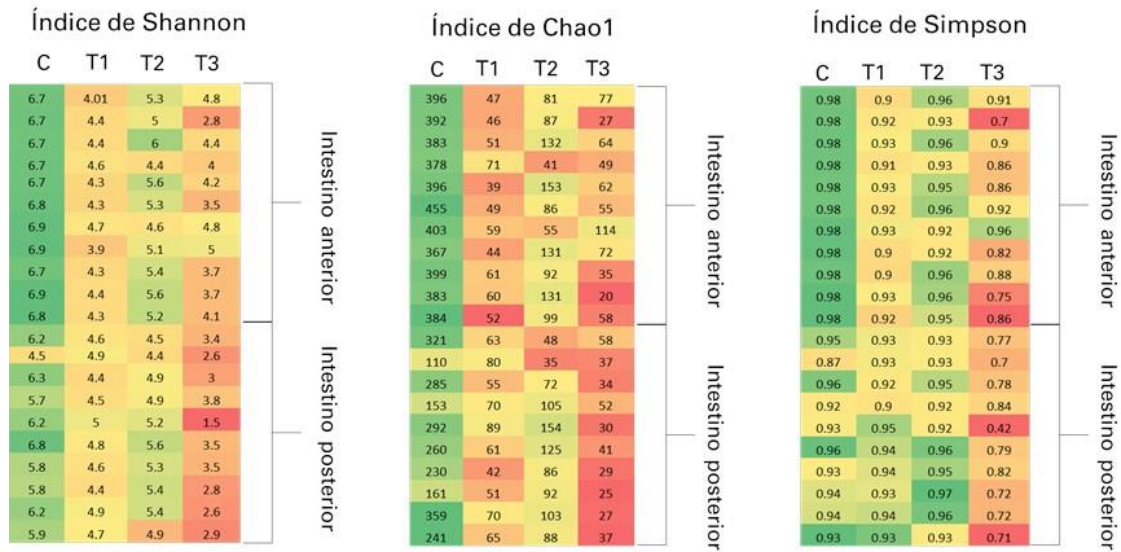
### 6.3 Análisis de Diversidad

La diversidad alfa se calculó utilizando la suite QIIME 2 a través del complemento q2-diversity. Los índices de diversidad alfa que se calcularon fueron Chao1, Shannon y Simpson para evaluar y realizar comparaciones detalladas de la distribución de la diversidad de especies entre las muestras de cada tratamiento y sección de intestino. La Figura 7 presenta tres tablas que muestran los índices de diversidad calculados para cada muestra en los diversos tratamientos y secciones.

Un valor más alto en el índice de Shannon indica una mayor diversidad de especies en la comunidad. Los valores más altos se observaron en el grupo control (en el rango de 4.5-6.9), mientras que estos valores disminuyeron en los tratamientos con ajo, particularmente en el T3 (25%). Por otro lado, el índice de Chao1, que refleja la riqueza de especies en la comunidad, también mostró valores más altos en el grupo control (en el rango de 110-455), mientras que los tratamientos con ajo obtuvieron valores más bajos.

Finalmente, el índice de Simpson mide la dominancia en una comunidad, es decir, cuánto dominan unas pocas especies en comparación con otras. Los valores altos sugieren una mayor diversidad, ya que indican una distribución más uniforme de la abundancia de especies. Se observó que los tratamientos con ajo presentaron índices más bajos en comparación con el grupo de control. Además, los valores calculados en la sección de intestino anterior fueron un poco más altos en comparación con la sección de intestino posterior, en los tres índices de diversidad alfa.

En resumen, se observó una disminución en la riqueza, diversidad y dominancia a medida que aumentaba la concentración de ajo en los tratamientos.



**Figura 7.** Tablas de los índices de diversidad alfa de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) alimentado con dietas adicionadas con diferentes concentraciones de polvo de ajo: T1= 4%, T2= 10%, T3= 25%, C= control.

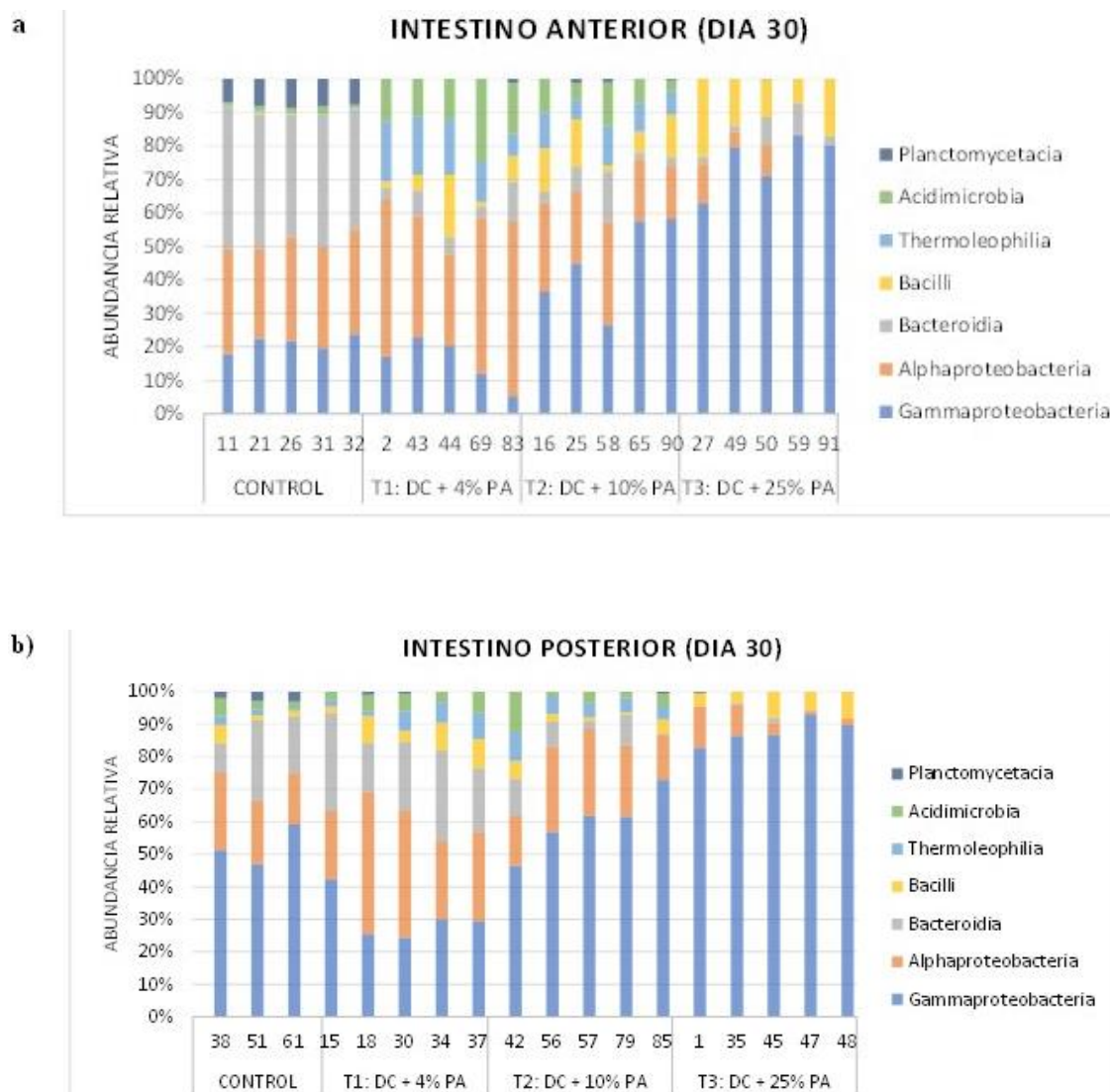
#### 6.4 Perfil Taxonómico

La mayoría de los ASVs se asignaron a los filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes y Planctomycetes. Proteobacteria y Bacteroidetes fueron los grupos bacterianos más predominantes en todas las muestras, independientemente de la dieta. A nivel de clase, los grupos taxonómicos predominantes en la estructura microbiana fueron Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidia, Bacilli, Thermoleophilia, Acidimicrobia y Planctomycetacia (Figura 8). Sin embargo, el consumo de ajo sí afectó la abundancia relativa de estas clases. Por ejemplo, en ambos segmentos del intestino, la abundancia relativa de la clase Gammaproteobacteria se incrementó en función de la concentración de ajo, mientras que las clases Alphaproteobacteria y Bacteroidia se redujeron significativamente (Figura 8).

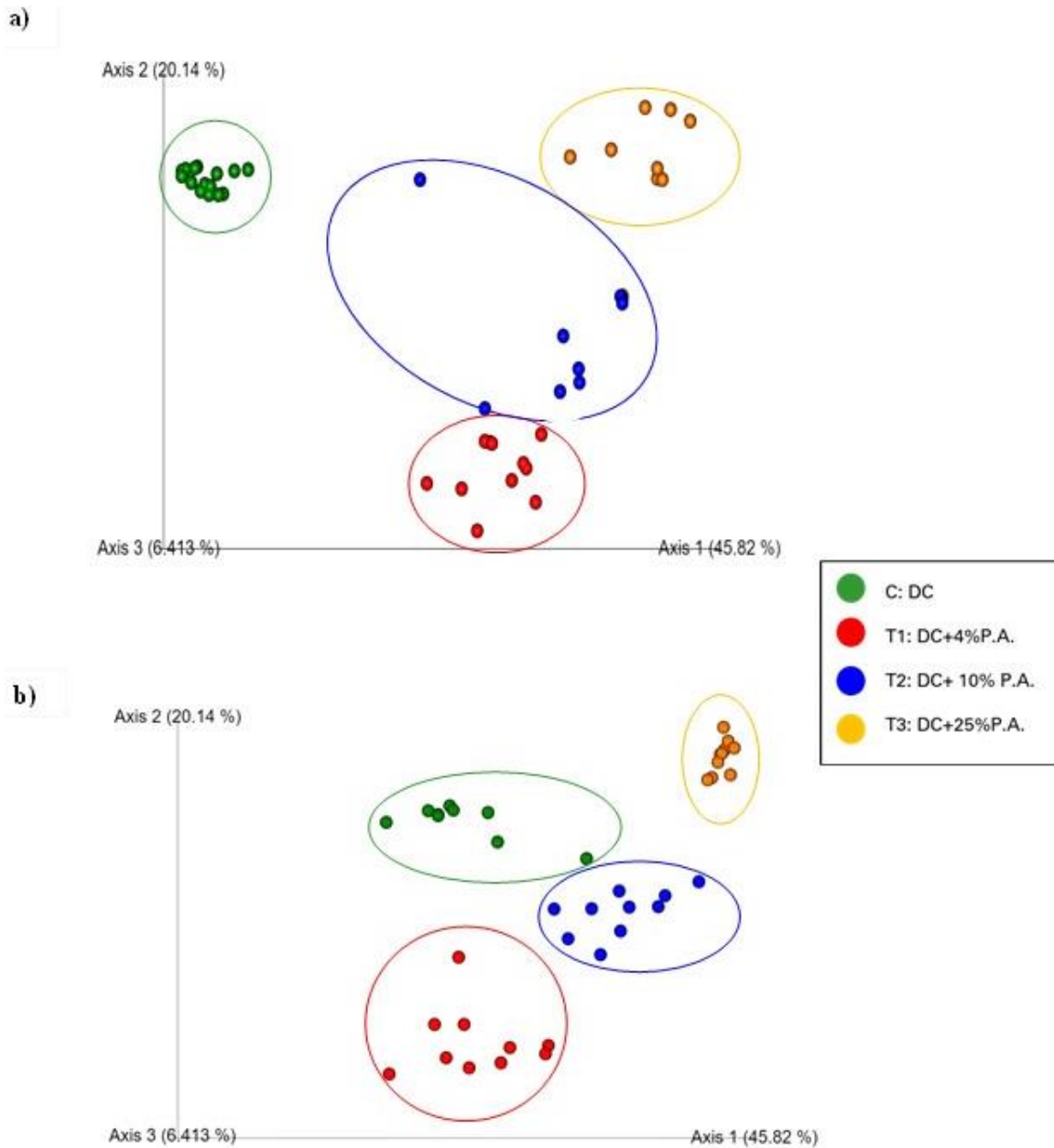
La clase Bacilli estuvo casi ausente en el intestino anterior del grupo control, pero aumentó a medida que incrementaba la concentración de ajo en el alimento; lo mismo se observó para las clases Thermoleophilia, Acidimicrobia y Planctomycetacia (Figura 8). Este mismo patrón se observó en el intestino posterior, excepto para la clase Bacilli.

El método de análisis multivariante basado en PCoA de matriz de distancia ponderada UniFrac

reveló una agrupación bien definida por tratamiento para ambas secciones de intestino y una clara separación entre tratamientos (Figura 9). La métrica UniFrac ponderadas registró más del 70 % de la varianza total. Usando esta métrica, la estructura de la comunidad microbiana presentó cuatro grupos principales para cada sección del intestino, siendo el control el grupo que más se diferenció. Esta diferenciación entre tratamientos fue validada por PERMANOVA, obteniendo diferencias significativas en las comparaciones pareadas entre tratamientos y en ambos segmentos intestinales (Cuadro 3).



**Figura 8.** Perfil taxonómico de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) alimentado con diferentes dietas adicionadas con ajo: T1= 4% T2= 10%, T3= 25%, C= control.



**Figura 9.** Análisis de coordenadas principales (PcoA) de la microbiota intestinal detectada en el intestino del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) alimentado con diferentes dietas adicionadas con ajo. a) PCoA del intestino anterior, b) PCoA del intestino posterior. Los plots se derivan de la prueba Unifrac ponderada. DC: dieta comercial, PA=polvo de ajo.

**Cuadro 3.** Análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) después de comparaciones pareadas entre las comunidades bacterianas detectadas en el intestino anterior y el intestino posterior del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) alimentados con dietas con diferentes concentraciones de ajo (*A. sativum*) (control, 4, 10 y 25%).

<b>Intestino anterior</b>				
<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>pseudo-F</b>	<b>p-value</b>	<b>q-value</b>
<b>T1 (4%)</b>	T2 (10%)	6.934458	0.0002	0.0002
<b>T1 (4%)</b>	T3 (25%)	16.15112	0.0002	0.0002
<b>T1 (4%)</b>	CONTROL	89.13914	0.0002	0.0002
<b>T2 (10%)</b>	T3 (25%)	5.74762	0.0002	0.0002
<b>T2 (10%)</b>	CONTROL	57.46994	0.0002	0.0002
<b>T3 (25%)</b>	CONTROL	76.23845	0.0002	0.0002

<b>Intestino posterior</b>				
<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>pseudo-F</b>	<b>p-value</b>	<b>q-value</b>
<b>T1 (4%)</b>	T2 (10%)	14.45326	0.0002	0.0003
<b>T1 (4%)</b>	T3 (25%)	46.23358	0.0004	0.0004
<b>T1 (4%)</b>	CONTROL	17.48189	0.0002	0.0003
<b>T2 (10%)</b>	T3 (25%)	15.01034	0.0002	0.0003
<b>T2 (10%)</b>	CONTROL	13.22322	0.0004	0.0004
<b>T3 (25%)</b>	CONTROL	41.04012	0.0002	0.0003

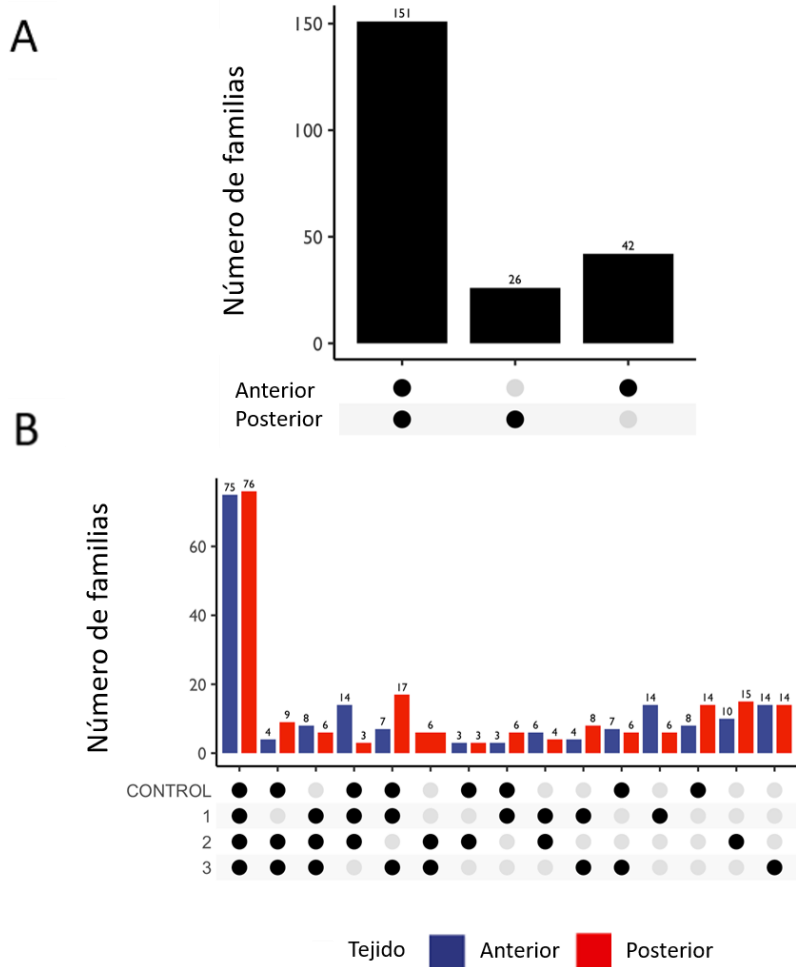
### 6.5. Análisis de Abundancia Diferencial (DA)

Para conocer cuales grupos taxonómicos a nivel de familia estaban propiciando diferencias de composición bacteriana entre tratamientos, se realizó un análisis de abundancia diferencial para comparar las abundancias relativas entre las fracciones del intestino anterior y posterior. Un total de 151 familias se compartieron entre segmentos de intestino independientemente del tratamiento, mientras que 26 y 42 se detectaron exclusivamente en el intestino posterior y el intestino anterior, respectivamente (Figura 10 A). La abundancia de algunas familias bacterianas fue considerablemente diferente entre las dos fracciones del intestino. Algunas de las familias abundantes en las muestras del intestino posterior, fueron Vibrionaceae, Pseudomonadaceae y Burkholderiaceae, mientras que en las muestras del intestino anterior las familias Microtrichaceae,

Demenquinaceae y Alcanivoraceae fueron significativamente más abundantes.

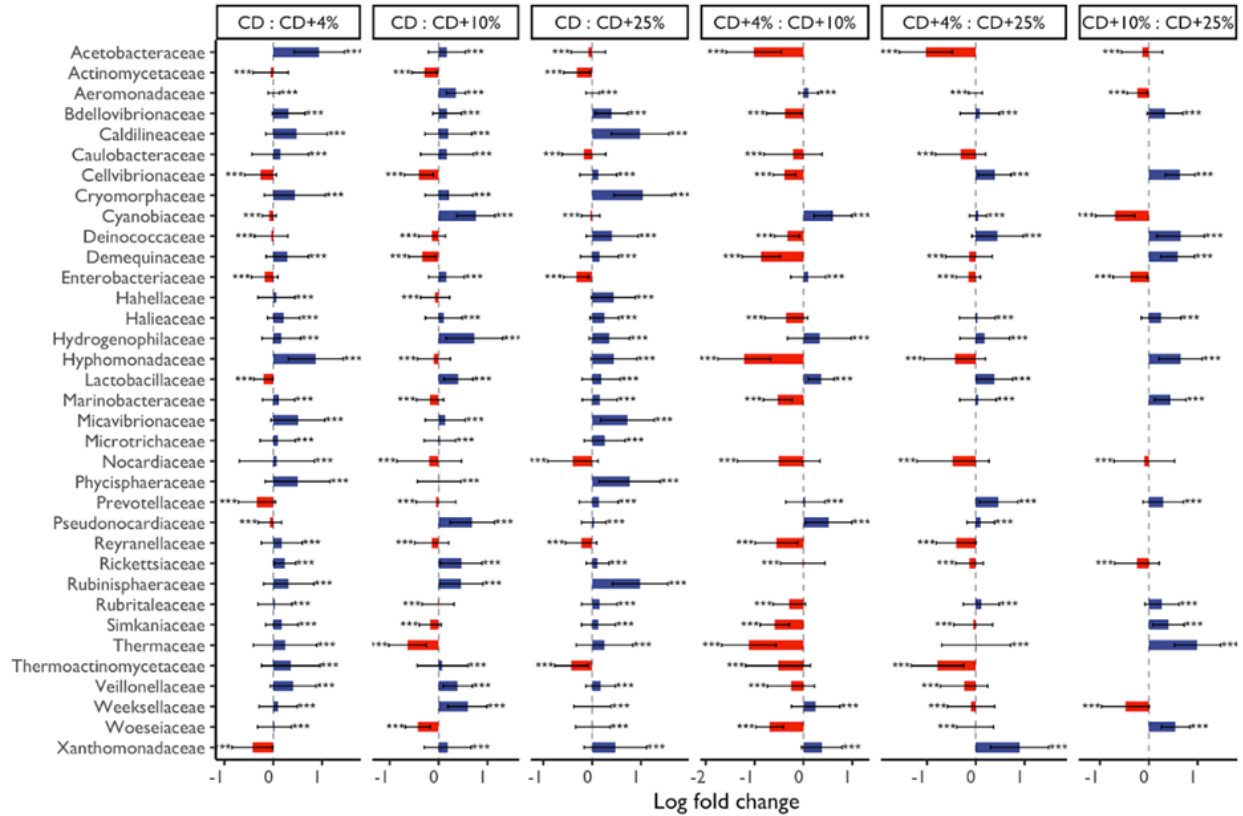
En cuanto a los tratamientos, se observó que la composición de las comunidades bacterianas varió considerablemente entre ellos y respecto al control, en cada sección de intestino. Las familias más abundantes en las muestras del grupo control fueron Thermaceae, Acetobactereaceae, Demenquinaceae, Hyphomonadaceae y Woeseiaceae, mientras que las familias Caldilineaceae, Cryomorphaceae, Micavibrionaceae, Rubinisphaeraceae estuvieron dentro de las más abundantes en todos los tratamientos.

Los resultados también revelaron que, a pesar de que se mantuvieron núcleos de microbiota de más de 70 familias tanto en el intestino posterior como en el anterior, la inclusión de ajo en la dieta (Figura 10 B) influyó en la ocurrencia y abundancia de las diferentes familias (Figuras 11 y 12). Estos cambios fueron más prominentes en los tratamientos con mayor concentración de ajo en comparación con el control (Figuras 11 y 12).

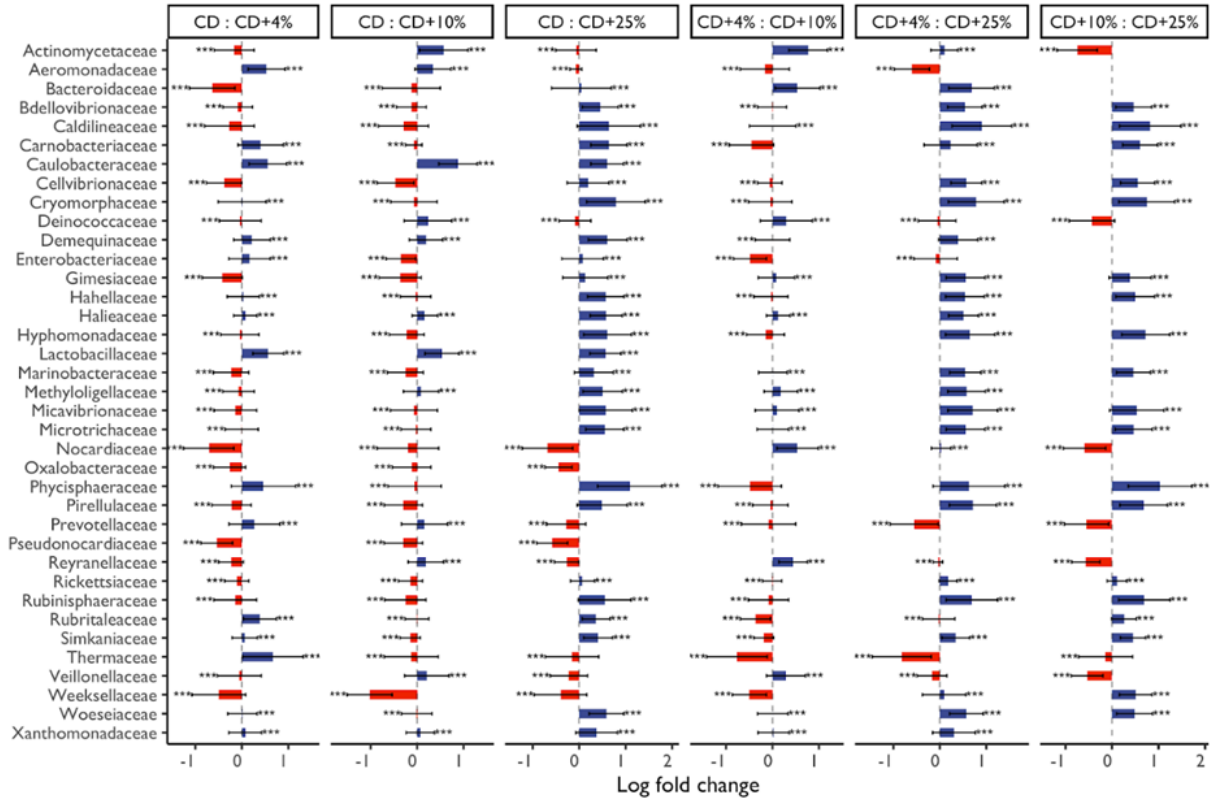


**Figura 10.** Ocurrencia de Familias a través de los segmentos intestinales (A) y tratamientos (B) con Control, 4 (1), 10 (2) y 25% (3) de inclusión de ajo en la dieta del jurel cola amarilla. Los puntos bajo la gráfica indican diferencias significativas en la ocurrencia de familias de bacterias entre las secciones de intestino y tratamientos. Gráfica realizada en el programa RStudio con la paquetería phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013).





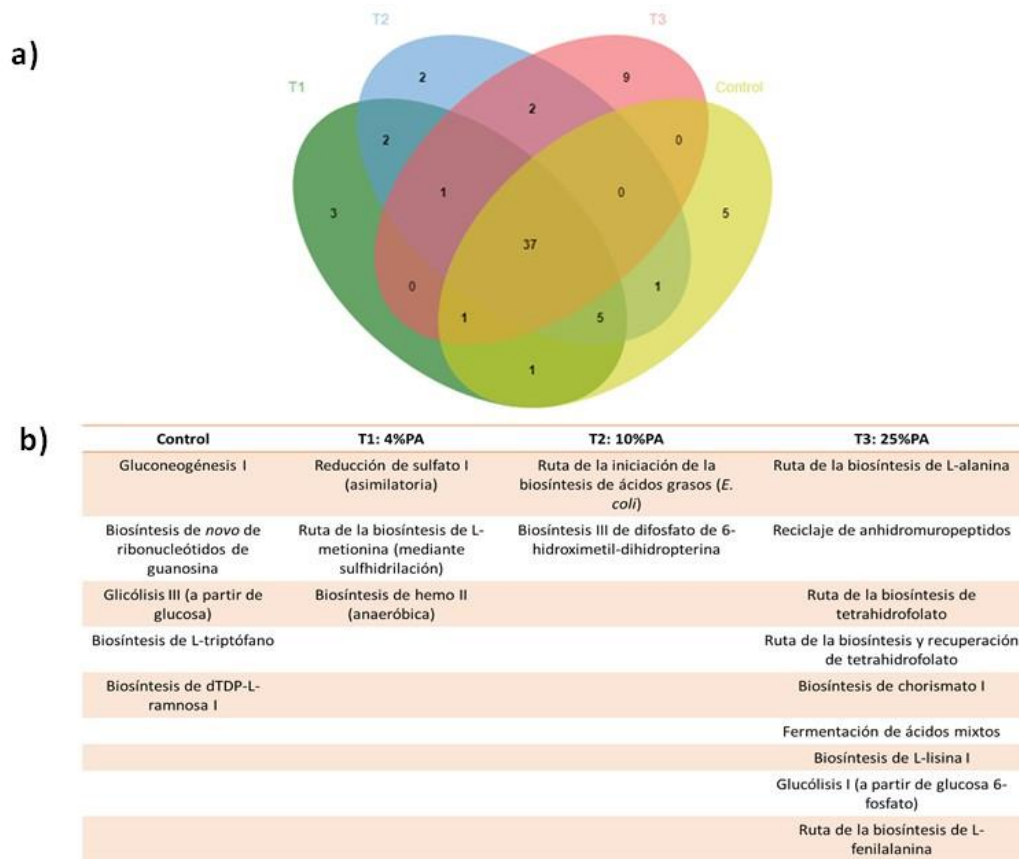
**Figura 11.** Abundancia diferencial de los principales grupos taxonómicos entre los tratamientos en el intestino anterior. El título del panel indica la dirección de la abundancia diferenciada. CD=dieta comercial. Gráfica realizada en el programa RStudio con la paquetería phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013).



**Figura 12.** Abundancia diferencial de los principales grupos taxonómicos entre los tratamientos en el intestino posterior. El título del panel indica la dirección de la abundancia diferenciada. CD=dieta comercial. Gráfica realizada en el programa RStudio con la paquetería phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013).

### 6.6. Predicción Funcional

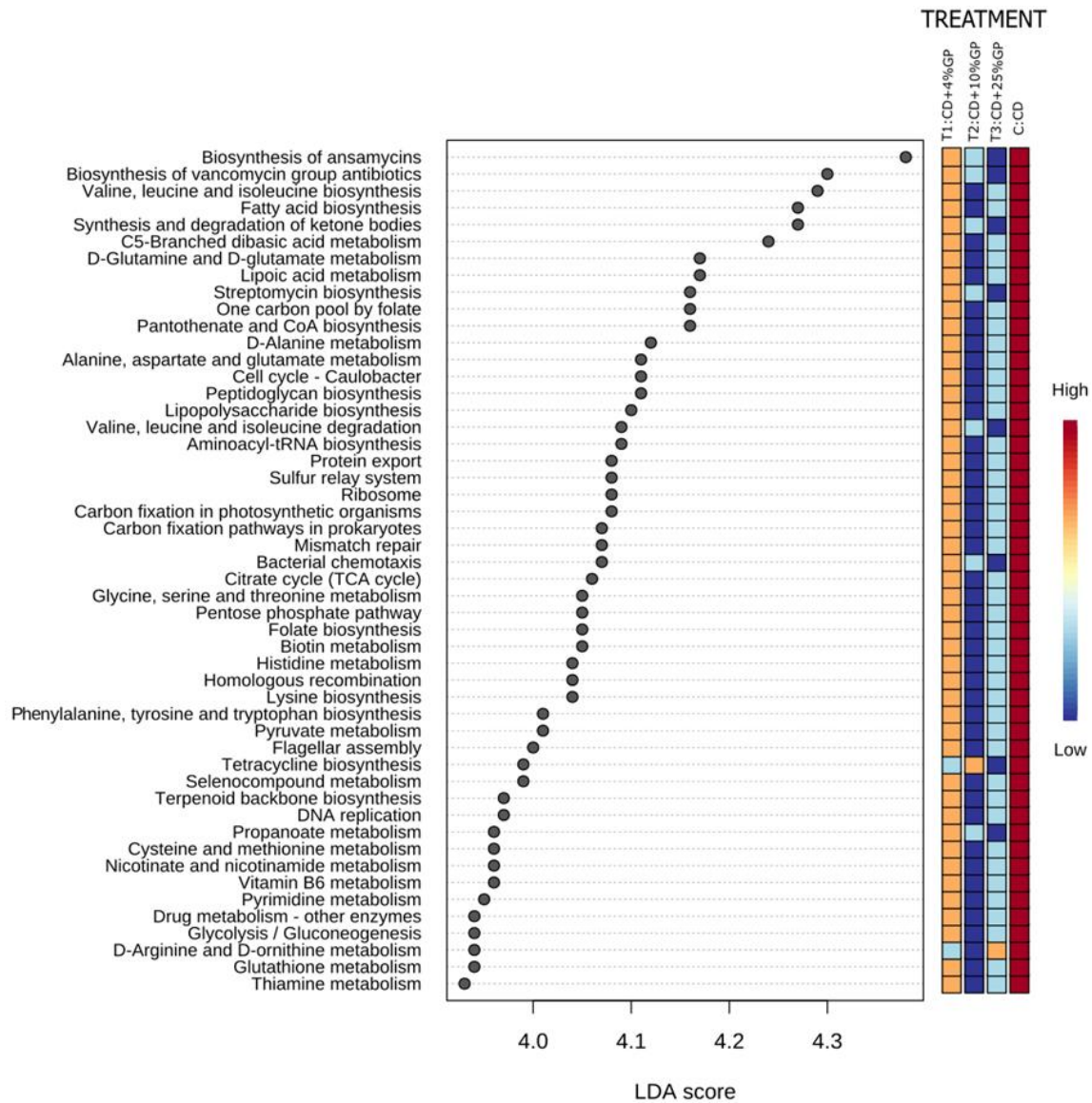
La distancia filogenética promedio (NSTI) de las ASVs encontradas en las muestras, en comparación con genomas microbianos completos ya secuenciados, fue de 0.30. En este sentido, valores NSTI <2 indican que las predicciones realizadas por PICRUST2 son confiables. Se observó que, de las 50 funciones más abundantes, 37 fueron comunes en todos los tratamientos y el grupo control (Figura 13a). Sin embargo, únicamente la función de oxidación de ácidos grasos estuvo presente en el T3 (25%). En relación al grupo de control y el T3 (25%), no se identificaron funciones compartidas; exclusivamente en el T3 (25%) se detectaron nueve funciones, marcando así la presencia más significativa de funciones exclusivas en un tratamiento (Figura 13b).



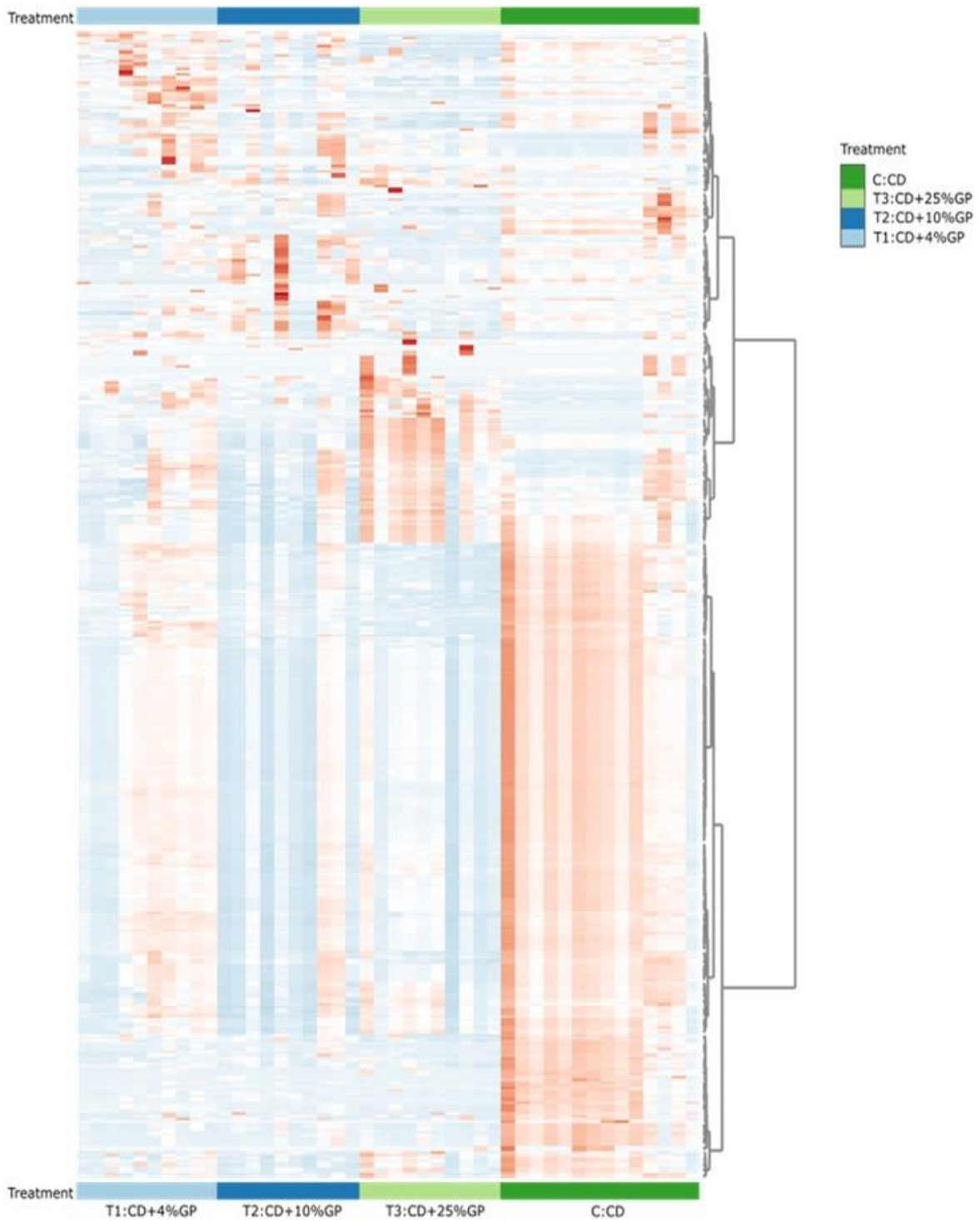
**Figura 13.** Diagrama de Venn donde se observan a) las funciones compartidas y exclusivas entre tratamientos y b) en la tabla se indican las funciones únicas presentes en cada tratamiento.

Las diferencias en el perfil taxonómico de la microbiota intestinal, causadas por el consumo de ajo, también se reflejaron en el potencial funcional de la microbiota intestinal. Particularmente, algunas funciones metabólicas se redujeron en los peces que consumieron altas concentraciones de ajo ( $\geq 10\%$ ); por ejemplo, las asociadas con el metabolismo de los carbohidratos (Figuras 14 y 15). En este sentido, el ciclo del ácido tricarboxílico, la gluconeogénesis, la glucólisis y las vías de las pentosas fosfato tendieron a disminuir a medida que aumentaba la concentración de ajo. Además, varias otras funciones, como el metabolismo de proteínas y lípidos y la síntesis de biomoléculas, disminuyeron cuando aumentaba la concentración de ajo.

Por otro lado, el potencial funcional de la microbiota también mostró diferencias según la sección del intestino. En el intestino anterior, las funciones se relacionaron con el ciclo de la urea, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la ruta de las pentosas-fosfato y la biosíntesis de biomoléculas, entre otras. En el intestino posterior, funciones como la degradación de la glucosa y la biosíntesis de aminoácidos se encontraban entre las más significativas.



**Figura 14.** Análisis discriminante lineal (LefSe), efecto-tamaño (LDA) en funciones de nivel 3 de KEGG detectadas en la microbiota intestinal del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) alimentados con diferentes dietas adicionadas con ajo: T1=4%, T2= 10%, T3= 25%, C= control. Gráfico realizado en el programa MicrobiomeAnalyst (Dhariwal *et al.*, 2017).

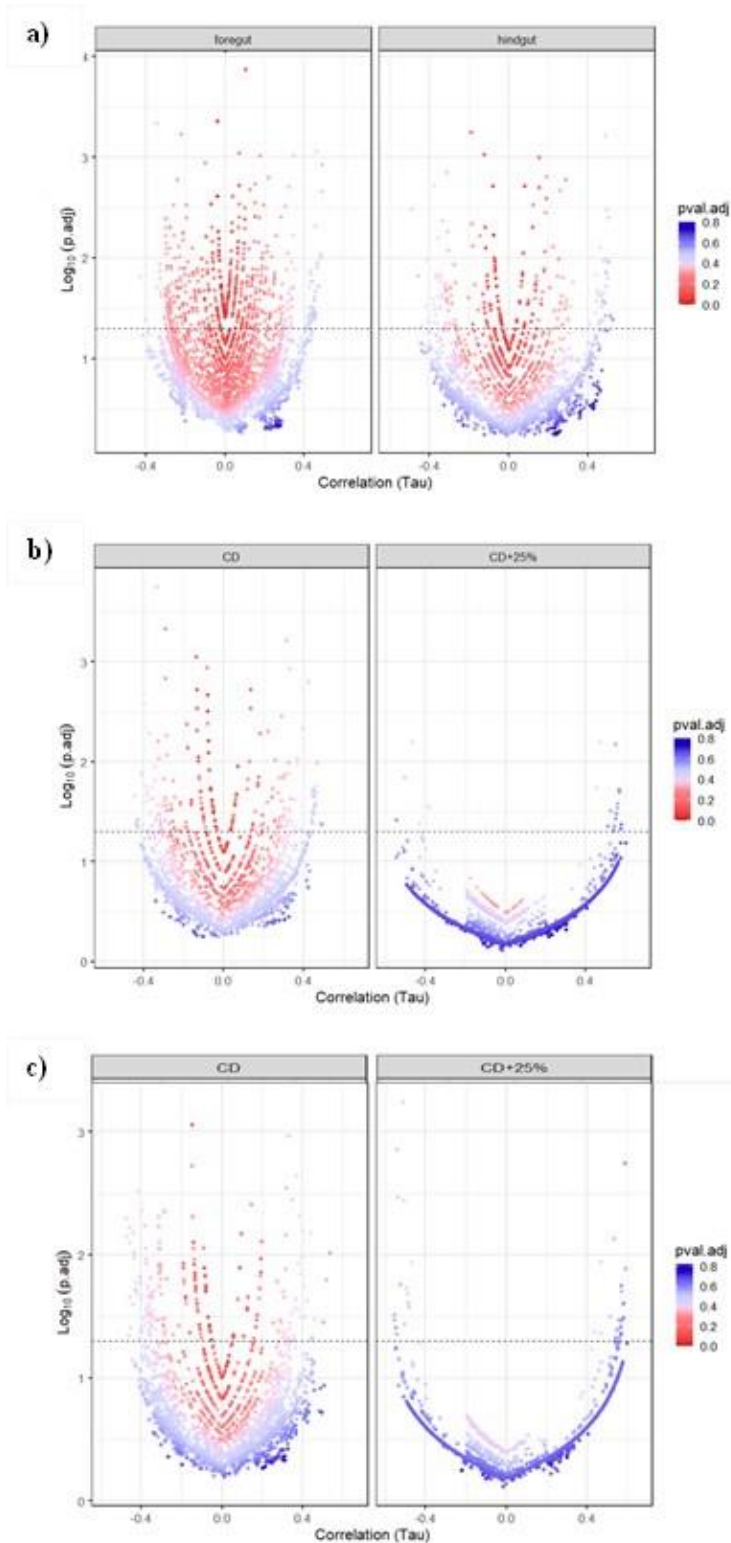


**Figura 15.** Mapa de calor de funciones potenciales de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) alimentado con diferentes dietas adicionadas con ajo: T1= 4%, T2= +10%), T3= 25%), C= control. Gráfico realizado en el programa MicrobiomeAnalyst (Dhariwal *et al.*, 2017).

## 6.7 Análisis de Redes de Interacción

En el análisis de red topológica ponderada (wTO) se detectaron características acumulativas a nivel de familia, con 13,861 interacciones entre 167 nodos (familias de bacterias) en el intestino anterior y 7,911 interacciones entre 134 nodos en el intestino posterior (independientemente del tratamiento) al 95 % de confianza (valor  $p_{adj} < 0,05$ ) (Figura 16a). Por otro lado, se encontraron 9,045 entre 135 nodos interacciones en el control y 7,381 interacciones entre 122 nodos en el tratamiento 3 (DC+25% PA) en intestino anterior al día 30 al 95 % de confianza (valor  $p_{adj} < 0,05$ ) (Figura 16b) y 8,911 interacciones entre 134 en el control y 10,296 interacciones entre 144 nodos en el tratamiento 3 (DC+25% PA) en intestino posterior al día 30 al 95 % de confianza (valor  $p_{adj} < 0,05$ ) (Figura 16c).



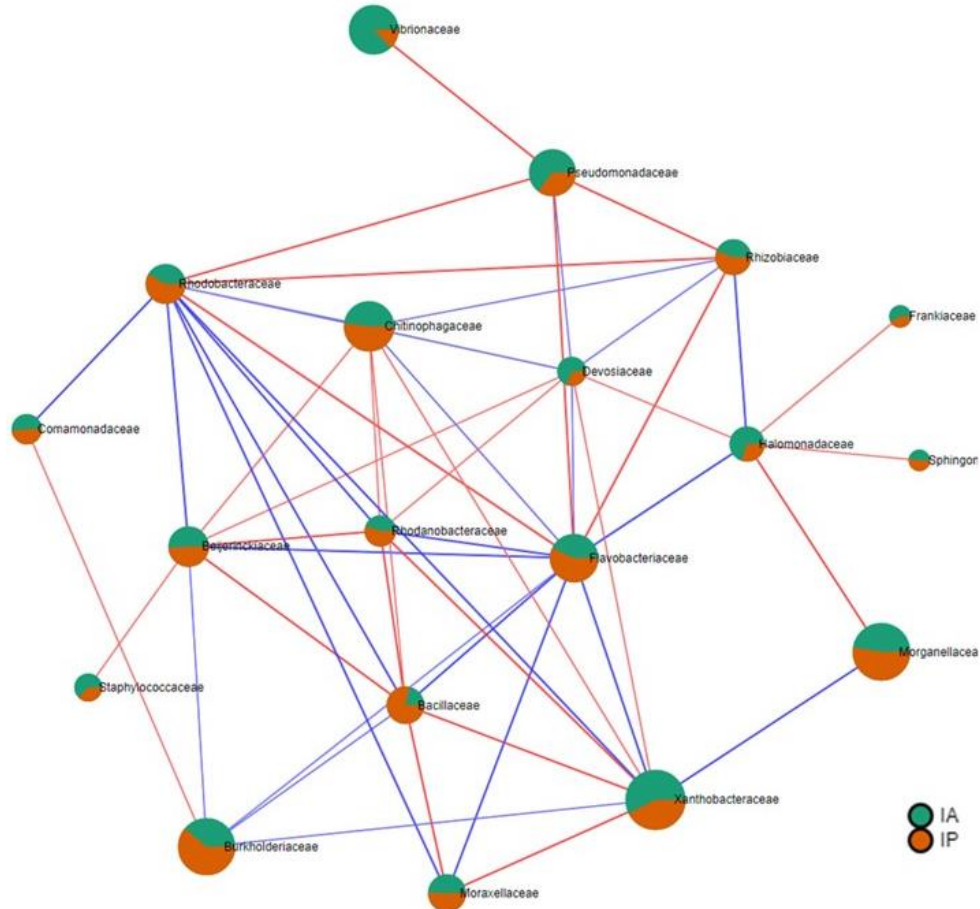


**Figura 16.** *Volcano Plot* de la significancia de las interacciones entre familias de bacterias. a) Comparación intestino anterior y posterior, b) comparación entre control y tratamiento tres en intestino, c) comparación entre control y tratamiento tres en intestino posterior. pval y pval.adj: significancia a  $p < 0.05$ . Gráfica realizada en el programa RStudio con la paquetería phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013).

Se registraron tres nodos (familias) clave en ambas secciones (Figura 17): Morganellaceae, Xanthobacteraceae y Burkholderiaceae, que representaron mayor grado de interacción en la comunidad bacteriana y se observa que, entre estos grupos principales, hay una interacción negativa (línea azul), lo cual pudiera indicar una especie de competencia entre estos grupos por recursos. Además, se observa que hay otros nodos interesantes interactuando en la comunidad, como la familia Pseudomonadaceae y Vibrionaceae, que mostraron interacciones positivas.

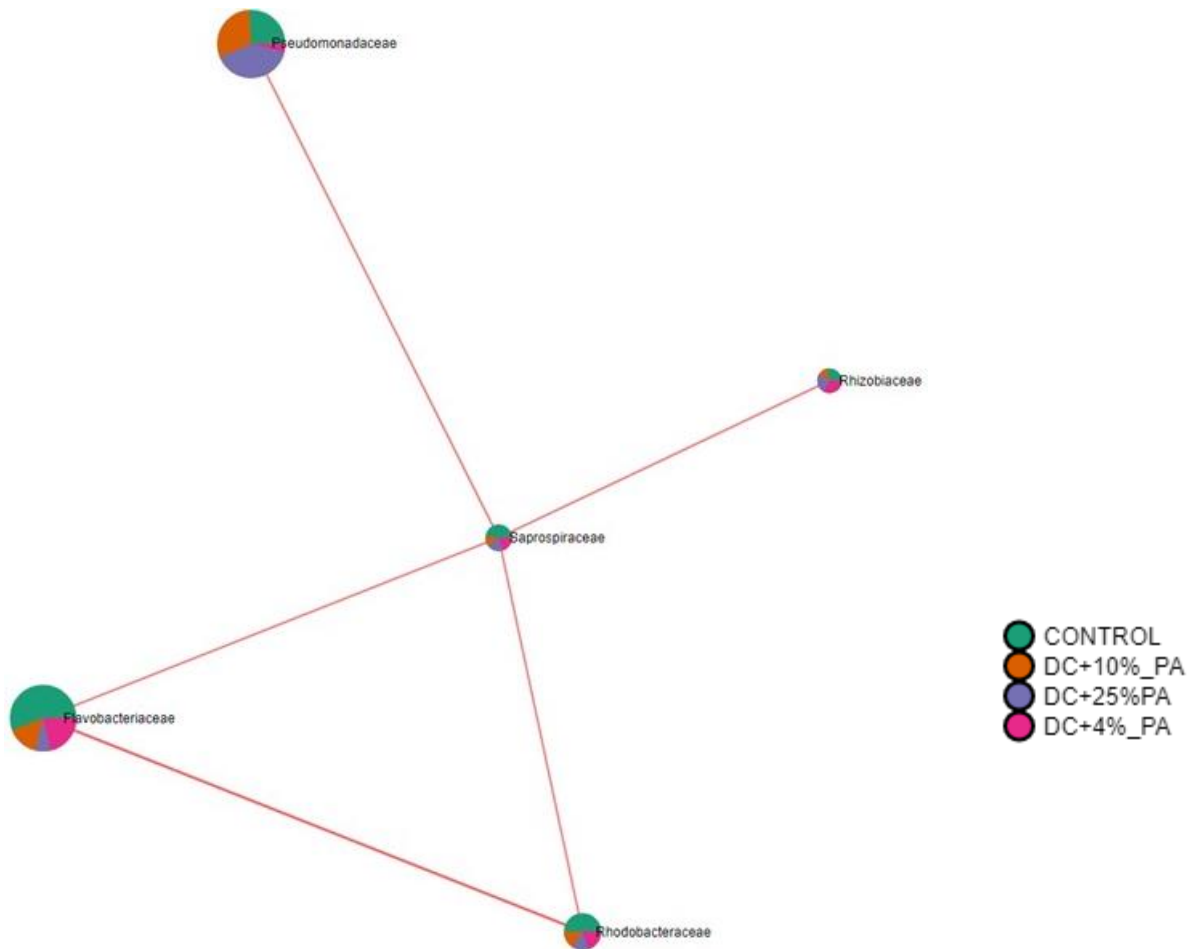
Por otro lado, en cuanto a los tratamientos en la sección de intestino anterior, se observaron cinco nodos clave (Figura 18). Dos familias Pseudomonadaceae y Flavobacteriaceae, fueron las que presentaron un mayor grado de interacción en la comunidad bacteriana y estas presentaron interacciones positivas entre ellas y el resto de los nodos. En cuanto a la sección de intestino posterior, las familias Flavobacteriaceae y Rhodobacteriaceae (Figura 19) presentaron mayor grado de interacción en la comunidad, y entre ellas presentaron interacciones positivas, mientras que con las familias Devosiaceae y Beijerinckiaceae presentaron interacciones negativas.





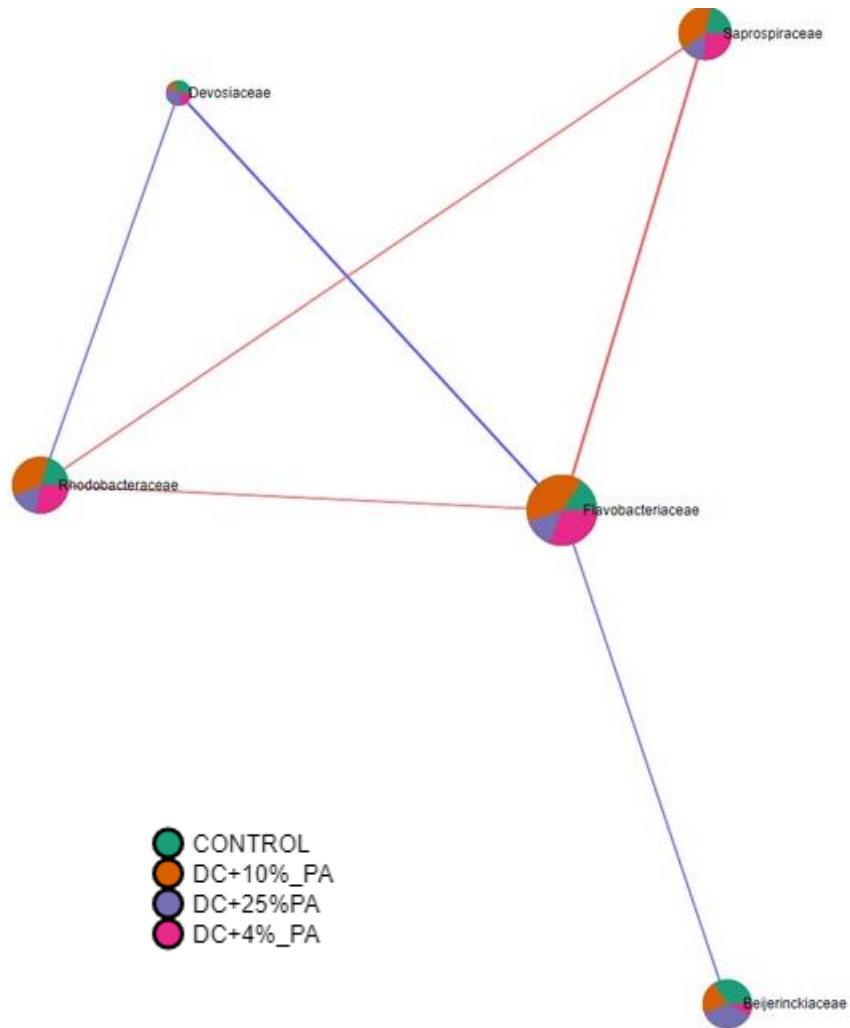
Taxon1	Taxon2	Correlación	Taxon1	Taxon2	Correlación
Rhodobacteraceae	Flavobacteriaceae	0.946831	Rhodobacteraceae	Chitinophagaceae	-0.78377
Xanthobacteraceae	Devosiaceae	0.771087	Flavobacteriaceae	Chitinophagaceae	-0.78779
Rhodobacteraceae	Rhizobiaceae	0.759646	Devosiaceae	Rhodobacteraceae	-0.81454

**Figura 17.** Gráfico de interacción de redes para comunidades microbianas en intestino anterior (IA) e intestino posterior (IP) a nivel de familia, utilizando análisis de estimación dispersa de correlaciones entre microbiomas (SECOM). Los enlaces de color azul son correlaciones positivas, mientras que los enlaces color naranja son correlaciones negativas. El tono de los enlaces indica qué tan fuerte es la interacción, y el grado de interacción dentro de las familias está representado por el tamaño del nodo. Tablas con las correlaciones positivas y negativas más altas.



Taxon1	Taxon2	Correlación
Saprospiraceae	Rhizobiaceae	0.959692433
Rhodobacteraceae	Flavobacteriaceae	0.954197284
Rhodobacteraceae	Saprospiraceae	0.943607683
Pseudomonadaceae	Saprospiraceae	0.932494646
Flavobacteriaceae	Saprospiraceae	0.921752078

**Figura 18.** Gráfico de interacción de redes para comunidades microbianas en los tratamientos a nivel de familia en intestino anterior, utilizando análisis de estimación dispersa de correlaciones entre microbiomas (SECOM). Los enlaces de color azul son correlaciones negativas, mientras que los enlaces de color naranja son las correlaciones positivas. El tono de los enlaces indica qué tan fuerte es la interacción, y el grado de interacción dentro de las familias está representado por el tamaño del nodo. Tabla de correlaciones positivas.



Taxon1	Taxon2	Correlación	Taxon1	Taxon2	Correlación
Rhodobacteraceae	Flavobacteriaceae	0.976973	Devosiaceae	Flavobacteriaceae	-0.96711
Flavobacteriaceae	Saprospiraceae	0.961909	Devosiaceae	Rhodobacteraceae	-0.98151
Rhodobacteraceae	Saprospiraceae	0.960662	Flavobacteriaceae	Beijerinckiaceae	-0.9855

**Figura 19.** Gráfico de interacción de redes para comunidades microbianas en los tratamientos a nivel de familia en intestino posterior, utilizando análisis de estimación dispersa de correlaciones entre microbiomas (SECOM). Los enlaces de color azul son correlaciones positivas, mientras que los enlaces color naranja son correlaciones negativas. El tono de los enlaces indica qué tan fuerte es la interacción, y el grado de interacción dentro de las familias está representado por el tamaño del nodo. Tablas con las correlaciones positivas y negativas más altas.

## 7. DISCUSIÓN

El uso de productos vegetales o derivados vegetales es una práctica común en los sistemas acuícolas, particularmente aquellos que buscan reemplazar los antibióticos; sin embargo, se sabe poco sobre su efecto en la microbiota intestinal ya que algunos, como el ajo, tienen compuestos antibacterianos, antiparasitarios y antioxidantes. La microbiota participa en diversas funciones del hospedero (Galindo-Villegas *et al.*, 2012); por ejemplo, desempeña un papel vital en la nutrición, en la protección contra bacterias patógenas y en el desarrollo del sistema inmunológico del hospedero (Bikel *et al.*, 2015, Ramirez y Romero, 2017). Los peces tienen una asociación significativa con la estructura de la microbiota intestinal, lo que sugiere una posible coevolución entre ellos llegando a crear una relación de codependencia (Sullam *et al.*, 2012, Ramirez y Romero, 2017).

Como resultado de este estudio, la adición de ajo generó cambios en el perfil taxonómico de la microbiota intestinal del jurel de cola amarilla, particularmente a concentraciones mayores al 10%. Los grupos taxonómicos más abundantes pertenecen a los filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes y Planctomycetes, que comúnmente se informan como parte de la microbiota intestinal en peces (Ramirez y Romero, 2017, Etyemez Büyükdeveci *et al.*, 2018), incluyendo el jurel de cola amarilla. Por ejemplo, Aguilera y colaboradores (2013), informaron que los filos predominantes en la etapa juvenil del jurel cola amarilla fueron Proteobacteria, Actinobacteria y Bacilli (una clase perteneciente al filo Firmicutes). Rubio y colaboradores (2016), documentaron que los filos más representativos en la microbiota intestinal del jurel cola amarilla silvestre adultos fueron Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes, así como los géneros *Leucobacter*, *Alcaligenes*, *Marinobacter* y *Psychrobacter*. Los filos Proteobacteria y Actinobacteria predominan en la microbiota intestinal de los peces marinos, lo que sugiere que estas bacterias están adaptadas a las condiciones intestinales y al entorno circundante (Tapia-Paniagua *et al.*, 2010, Xing *et al.*, 2013).

Por otro lado, las clases más abundantes de bacterias fueron Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidia, Bacilli, Thermoleophilia, Acidimicrobia y Planctomycetacia, las cuales han sido reportados como parte de la microbiota intestinal típica en peces marinos (Ramirez y Romero, 2017). Además, la adición de 10% o más de ajo a la dieta causó un aumento de

Gammaproteobacterias. Aunque esta clase es constitutiva de la microbiota intestinal de los peces, y varios miembros están relacionados con la producción de enzimas digestivas que contribuyen a la nutrición de los peces (Ray *et al.*, 2012), la adición de 10% o más de ajo promovieron su dominio, reduciendo la diversidad bacteriana.

Se observó un aumento de las clases Bacilli, Thermoleophilia y Acidimicrobia en el intestino anterior de los peces alimentados con ajo. Bacilli incluye a *Bacillus* sp. y *Lactobacillus* sp., bacterias beneficiosas que se han reportado como probióticos (Romero *et al.*, 2014). La clase Bacilli en todos los tratamientos, mientras que las clases Thermoleophilia y Acidimicrobia se incrementaron en las concentraciones de 4 y 10%; Estas clases disminuyeron su abundancia en los peces alimentados con la concentración más alta de ajo (25%). Este hallazgo sugiere que, la disminución de las clases Thermoleophilia y Acidimicrobia podría estar relacionada con los componentes bactericidas presentes en el ajo.

Por su parte, las clases Alphaproteobacteria y Bacteroidia, miembros comunes de la microbiota intestinal en los peces y desempeñan funciones relacionadas con el sistema inmunológico (Michl *et al.*, 2017, Nyman *et al.*, 2017), mostraron una disminución a medida que aumentaba la concentración de ajo en la dieta. Además, la clase Planctomycetacia, presente en ambas secciones intestinales, disminuyó cuando los peces consumieron ajo y casi desaparecieron en las concentraciones más altas. Aunque el papel preciso de estas bacterias en el intestino no está completamente esclarecido, se han señalado como participantes activos en la digestión de celulosa y prosperan al depender de los subproductos generados por otros procesos metabólicos (Heras y Martin, 2021).

En general, los resultados indican que el ajo dietético proporcionado a altas concentraciones causa un detrimento de los miembros regulares de la microbiota intestinal de jurel cola amarilla. Además, los análisis de diversidad beta también revelaron que el perfil taxonómico de la microbiota se modificó significativamente al disminuir la riqueza y abundancia de bacterias a concentraciones más altas de ajo.

El ajo posee compuestos bioactivos que proporcionan diversas propiedades biológicas que aumentan la resistencia de los peces a las enfermedades (Shakya y Labh, 2014, Erguig *et al.*, 2015, Foyosal *et al.*, 2019). Uno de ellos es la actividad antibacteriana conferida por la alicina, que participa en la biosíntesis de lípidos y la síntesis de ARN en bacterias, demostrando la capacidad de inhibir bacterias gram-positivas y gram-negativas (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013)

fármacos (Ankri y Mirelman, 1999); sin embargo, la actividad antibacteriana de los compuestos de ajo es inespecífica, por lo que, como en el caso de ciertos antibióticos de amplio espectro, la microbiota, en general, puede ser vulnerable ante la presencia de altas concentraciones de estos compuestos y, por lo tanto, se podría esperar que altas concentraciones de ajo tuvieran una influencia significativa sobre el perfil taxonómico y funcional de la microbiota.

El análisis de abundancia diferencial (DA), al comparar las fracciones del intestino anterior y posterior, así como entre los diferentes tratamientos, reveló que ciertas familias abundantes en ambas fracciones del intestino son constituyentes principales de la microbiota intestinal en diversas especies de peces marinos (Pérez *et al.*, 2010, Ramirez y Romero, 2017). La familia más predominante en la sección de intestino posterior fue Vibrionaceae.

En el intestino posterior, ocurre la absorción de azúcares simples por parte de las células del hospedero, lo que provoca una alteración significativa en las fuentes de energía disponibles para el crecimiento bacteriano. Esta modificación resulta en cambios en la composición bacteriana. Es importante destacar que la mayoría de los carbohidratos disponibles en esta región son carbohidratos complejos, como polisacáridos derivados de la dieta o del propio hospedero, como la mucina y los restos celulares. Estos carbohidratos no pueden ser digeridos por el hospedero, lo que implica que están disponibles para la fermentación por parte de las bacterias intestinales (Bairagi *et al.*, 2002).

Las bacterias pertenecientes a la familia Vibrionaceae pueden digerir polisacáridos y, por lo tanto, pueden usar carbohidratos como fuente de energía (Fjellheim *et al.*, 2007). Por consiguiente, esto podría explicar por qué la abundancia de bacterias en la familia Vibrionaceae es mayor en el intestino posterior en comparación con el intestino anterior.

En el grupo control, las familias Flavobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae, Saprospiraceae y Physcispharaceae fueron las más abundantes. Particularmente en el tratamiento número tres (25% de dietas de ajo en polvo), las familias Morganellaceae, Pseudomonaceae, Halomonadacea, Thermanaceae y Alcaligenaceae solo aparecieron en ese grupo. Varios miembros de estas familias se consideran patógenos; por ejemplo, en la familia Morganellaceae, la bacteria *M. morganii* ha sido reconocida como un patógeno cada vez más importante (Kim *et al.*, 2000, Reshma *et al.*, 2018). Esta bacteria se ha asociado con la producción de histamina, y los altos niveles de este compuesto se asocian, a su vez, con trastornos inflamatorios de la mucosa; también puede estimular la secreción de citoquinas proinflamatorias que causan inflamación intestinal

(Bjornsdottir-Butler *et al.*, 2015). Por otro lado, la familia Halomonadaceae generalmente habita ambientes con alto contenido de sal, y algunos miembros de esta familia han sido descritos como patógenos oportunistas. (Stevens *et al.*, 2009, Raymann *et al.*, 2017).

En un estudio realizado por Kim y colaboradores (2019), se investigaron los efectos de diferentes concentraciones de antibióticos en peces. Los resultados revelaron que algunas familias bacterianas, presentes en menor proporción en el intestino de los peces, fueron diferencialmente abundantes entre los tratamientos con antibióticos; se observó un aumento en la abundancia de las familias Halomonadaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae y Xanthobacteraceae después de agregar antibióticos en altas concentraciones, demostrando así que los antibióticos pueden afectar a la comunidad intestinal al reducir su diversidad y, en algunos casos, pueden conducir a un aumento significativo de patógenos oportunistas que causan disbiosis.

Además, la fuerte influencia del ajo en concentraciones más altas ( $\geq 10\%$ ) en el perfil taxonómico de la microbiota intestinal también se reflejó en el potencial funcional de la microbiota. Esto es relevante, ya que los cambios en la microbiota intestinal no implican necesariamente modificaciones significativas en el perfil funcional debido a una condición conocida como “redundancia funcional” que ocurre en diferentes taxones bacterianos; por ejemplo, muchos microorganismos coexistentes pero aun siendo taxonómicamente distintos pueden codificar genes para realizar las mismas funciones metabólicas (Louca *et al.*, 2018). Sin embargo, en el caso de concentraciones elevadas de ajo, existe el riesgo de que se pierdan funciones relevantes proporcionadas por la microbiota intestinal debido a los efectos del ajo en la comunidad bacteriana. En cuanto a los cambios en las funciones de la microbiota intestinal, el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos disminuyeron en los peces alimentados con la mayor concentración de ajo. El metabolismo depende de la inclusión de estos en la dieta (Krogdahl *et al.*, 2005), pero se ha informado que la microbiota intestinal del jurel cola amarilla puede desempeñar un papel en la metabolización de carbohidratos, lípidos, vitaminas y aminoácidos consumidos por estos peces (Ramirez y Romero, 2017). Así, alteraciones que impliquen una disminución del poder metabólico de la microbiota podrían afectar al rendimiento nutricional de los peces. En el metabolismo de proteínas la microbiota intestinal degrada aminoácidos y proteínas de la dieta o metaboliza nutrientes a través de la fermentación para la formación de diferentes compuestos (por ejemplo, óxido nítrico, amoníaco, poliamidas, sulfuro de hidrógeno, entre otros) que son necesarios para el mantenimiento de la salud intestinal (Dai *et al.*, 2011, Macfarlane y Macfarlane, 2012).

Además, en el intestino, la treonina se utiliza para la síntesis de mucinas, que son glicoproteínas que desempeñan un papel crucial en la protección y preservación de la integridad de la mucosa intestinal. Estas mucinas son fundamentales para mantener la función adecuada de la barrera epitelial del intestino, lo que ayuda a protegerlo de posibles daños y garantiza su correcto funcionamiento (Hensel *et al.*, 2014, Yang y Liao, 2019). Por lo que, disminuciones de este tipo de funciones podrían comprometer la integridad y mantenimiento del óptimo estado de salud intestinal de los peces.

En cuanto al metabolismo de los ácidos grasos y los lípidos, que son esenciales en los procesos biológicos en los peces, la microbiota intestinal es un regulador clave (Zhou *et al.*, 2018). Las bacterias anaeróbicas contribuyen a la nutrición de los peces al proporcionar ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Cámara-Ruiz *et al.*, 2020), que son una fuente de energía y están asociados con el sistema inmunológico al ayudar a mantener el epitelio y la resistencia contra patógenos (Armstrong *et al.*, 2019, Salas-Leiva *et al.*, 2020). Por lo tanto, la disminución de la abundancia de vías como la gluconeogénesis, la glucólisis y el fosfato de pentosa en peces alimentados con alta concentración de ajo indica posiblemente que la microbiota asociada con estas funciones disminuyó en abundancia y perdió miembros, lo que representa riesgo de disbiosis.

En cuanto a las observaciones en las secciones de intestino, en la parte anterior se incrementaron funciones relacionadas a la activación del ciclo de la urea, la ruta de las pentosas-fosfato y el ciclo de los ácidos tricarbónicos y funciones relacionadas con el aumento del estrés oxidativo. Se ha reportado que el estrés oxidativo es un proceso relevante en la asfixia perinatal en peces, ya que puede influir en la salud celular, la función de los órganos y el desarrollo de los organismos en esta etapa crítica (Solevåg *et al.*, 2021). En la parte posterior, la degradación de la glucosa y la biosíntesis de aminoácidos como la alanina y la arginina fueron las funciones más representadas. Se ha demostrado que la presencia de microplásticos aumenta la glucosa y aminoácidos en el pez cebra. En un estudio realizado por Qiao y colaboradores (2019), se informó que la glucosa y los aminoácidos como la alanina aumentaron significativamente en el intestino del pez cebra sometidos a estrés debido a la exposición a microplásticos. El aumento de la glucosa está relacionado con estados proinflamatorios, y su propósito radica en facilitar su absorción por las células del sistema inmunológico, las cuales utilizan la glucosa como una fuente de energía (Hotamisligil, 2006). Esto sugiere una correlación entre el estado de estrés y su capacidad para alterar el sistema inmunológico de los peces, lo que a su vez influye en la regulación de los niveles de glucosa y aminoácidos en el



intestino.

El análisis de redes mostró la existencia de familias clave en ambas secciones de intestino como Morganellaceae, Xanthobacteraceae y Burkholderiaceae, las cuales parecen coexistir con una relación positiva en la comunidad bacteriana. Se ha reportado que estos grupos pueden estar presentes en diferentes hábitats y ser parte de la microbiota de animales (Saddler y Bradbury, 2005, Estrada-De Los Santos *et al.*, 2016) y sus funciones se centran en la degradación de compuestos orgánicos y la fijación de nitrógeno en el caso de la familia Xanthobacteraceae (Fei *et al.*, 2020). En cuanto a las familias Burkholderiaceae y Morganellaceae, se ha reportado que estos grupos contienen numerosas bacterias patógenas en humanos y animales, incluyendo patógenos oportunistas como los géneros *Burkholderia* y *Pandora* que se encuentran en los pulmones de pacientes con fibrosis quística y *M. morganii* que ha sido reconocida como un patógeno importante (Schaffer, 2015, Reshma *et al.*, 2018). Una posible explicación de su interacción positiva, es que pudieran estar interactuando entre ellas para llevar a cabo diferentes funciones, como por ejemplo compartir genes de resistencia a través de transferencia horizontal de genes; sin embargo, no se conocen relaciones simbióticas entre estas familias.

Las interacciones en el tratamiento tres (25% PA), respecto al grupo control en el intestino anterior se centraron en dos familias: Pseudomonadaceae y Flavobacteraceae, que podrían tener una interacción simbiótica entre ellas. Las bacterias pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes entornos, tanto como saprófitos de vida libre en suelos, agua dulce y ambientes marinos, así como agentes causantes de enfermedades en plantas y animales (Drobish *et al.*, 2016). Su capacidad para metabolizar una amplia variedad de nutrientes, es lo que le permite una amplia distribución en suelos de diversos hábitats (Roquigny *et al.*, 2017). El género más conocido dentro de esta familia es *Pseudomonas*, el cual incluye especies como *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista en humanos (Wu *et al.*, 2015).

La familia Flavobacteriaceae es una familia de bacterias gram-negativas perteneciente al orden Flavobacteriales. El género más prominente dentro de esta familia es *Flavobacterium*, el cual incluye muchas especies que desempeñan un papel importante en la descomposición de materia orgánica y la formación de biopelículas en los ecosistemas acuáticos (Bernardet, 2011). Algunas especies de *Flavobacterium* también están asociadas con enfermedades en peces y otros organismos acuáticos como *Flavobacterium psychrophilum*, el agente etiológico de la enfermedad bacteriana del agua fría y el síndrome de alevines de trucha arcoíris (Nematollahi *et al.*, 2003,

Starliper, 2011); *Flavobacterium columnare*, el agente causal de la enfermedad columnaris (lesiones blancas o grises en la piel, aletas y branquias) y *Flavobacterium branchiophilum*, el supuesto agente de la enfermedad bacteriana de las branquias (Shotts Jr y Starliper, 1999). En general, no se conocen relaciones simbióticas específicas entre estas dos familias de bacterias, es posible que, en ciertas situaciones, como en ambientes acuáticos o en intestino, donde ambas familias de bacterias pueden coexistir, puedan interactuar de manera indirecta o influenciarse mutuamente a través de procesos más amplios, como la degradación de alimentos o la transformación de nutrientes.

En intestino posterior, las familias Flavobacteriaceae y Rhodobacteriaceae fueron claves en la comunidad y presentaron interacciones positivas en el tratamiento tres, respecto al control. La familia Rhodobacteriaceae es un importante grupo, su abundancia puede estimularse mediante la adición de carbohidratos y ayuda a reducir el estrés en camarón blanco (Dong *et al.*, 2023). Específicamente, las familias Flavobacteriaceae y Beijerinckiaceae presentaron interacciones negativas. Una posible explicación de esta red es que estos podrían competir por recursos de nutrientes o sitios de adhesión. La familia Beijerinckiaceae comprende bacterias aeróbicas que tienen la capacidad de formar gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato y fijar nitrógeno. Además, estas bacterias tienen la capacidad de aumentar la producción de exopolisacáridos (Marin y Arahal, 2014). La investigación sobre bacterias fijadoras de nitrógeno en organismos acuáticos como simbioses ha sido limitada. Sin embargo, se han registrado procesos de fijación de nitrógeno en la comunidad microbiana presente en el tracto digestivo de especies de teleosteos, como el bagre *Panaque nigrolineatus* (McDonald *et al.*, 2015). Lo anterior deja en evidencia que se requieren investigaciones adicionales para comprender mejor las posibles interacciones simbióticas entre estas familias.

La adición de ajo al 25% tiene un impacto significativo en las redes de interacción de la microbiota del jurel. Esto se evidencia a través de la presencia destacada de familias de bacterias asociadas a enfermedades infecciosas en organismos acuáticos. Los análisis de redes de interacción revelaron que estas familias tienen un peso importante en la comunidad bacteriana y muestran interacciones fuertes.

Con base en los resultados obtenidos, resulta evidente que el ajo modificó la composición de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) al reducir la diversidad y abundancia de especies bacterianas importantes, dando lugar a modificaciones funcionales. Además, la evidencia

indica que la adición de altas concentraciones de ajo no favorece la proliferación de bacterias beneficiosas en esta especie. En cambio, reducir la riqueza de especies bacterianas parece causar un desequilibrio de la microbiota, favoreciendo la colonización de bacterias patógenas; un efecto similar al de los antibióticos. El uso de antibióticos provoca alteraciones que pueden afectar la relación mutualista entre la microbiota y el hospedero, lo que podría conducir a la desregulación inmune y aumentar la susceptibilidad a la enfermedad o promover la colonización de patógenos oportunistas (Francino, 2016, Kim *et al.*, 2019). El uso de altas concentraciones de ajo durante un largo período podría tener el mismo efecto sobre la microbiota intestinal que el uso de antibióticos debido a los diferentes compuestos activos en el ajo que le proporcionan propiedades antibacterianas de amplio espectro como muchos antibióticos (Soliman *et al.*, 2019, Erlong Wang *et al.*, 2019). En la literatura, la concentración máxima en las dietas de peces es de 4% de ajo en polvo, lo que cambia la composición de la microbiota intestinal (Talpur y Ikhwanuddin, 2012, Muzaffar *et al.*, 2017, Etyemez Büyükdeveci *et al.*, 2018), por lo que el uso de concentraciones mayores no resulta recomendable.

Como se mencionó, la microbiota intestinal se considera un órgano adicional que desempeña un papel importante no solo en la digestión y absorción de nutrientes, sino también en el desarrollo, crecimiento y salud general del hospedero. La microbiota intestinal influye en el eje intestino-cerebro y ayuda a mantener la homeostasis del hospedero (Borrelli *et al.*, 2016, Butt y Volkoff, 2019, Cornuault *et al.*, 2022). Como cualquier órgano, si se ve afectado, pierde partes de sus funciones, lo que se refleja en la salud del organismo. En este sentido, se puede señalar que el ajo se puede utilizar en dosis más bajas, porque en dosis más altas afecta desfavorablemente a la microbiota intestinal del jurel cola amarilla al reducir las bacterias comensales y la función general de la microbiota.

## 8. CONCLUSIONES

La adición de ajo en el alimento cambia la composición del perfil taxonómico en la microbiota intestinal del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*), observable por la disminución en la riqueza y abundancia de especies bacterianas.

La administración de altas concentraciones de ajo estimuló el aumento de la abundancia de bacterias de las familias Morganellaceae, Pseudomonaceae, Halomonadaceae, Thermanaceae y Alcaligenaceae.

La composición de la microbiota fue diferente en el intestino anterior y en el posterior., estimulando el aumento de familias como las Vibrionaceae en el intestino posterior, bacterias conocidas por utilizar carbohidratos complejos como fuente de energía, que no son digeribles por el hospedero.

La adición de ajo en el alimento cambio el potencial funcional de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*), al reducir funciones como el metabolismo de carbohidratos, proteínas, lípidos y síntesis de biomoléculas.

Las funciones en las distintas secciones del intestino también fueron diferentes, en el intestino anterior predominaron funciones relacionadas con el ciclo de la urea, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la vía de las pentosas-fosfato y la biosíntesis de biomoléculas, y en el intestino posterior funciones como descomposición de la glucosa y biosíntesis de aminoácidos.

Las redes de interacción, así como el número de nodos o familias clave en la comunidad bacteriana en intestino del jurel cola amarilla (*S. dorsalis*) parecen disminuir en la microbiota de peces alimentados con altas concentraciones de ajo.

Las familias Pseudomonadaceae y Flavobacteraceae, fueron las familias clave en intestino anterior, así como Flavobacteraceae y Rhodobactereaceae en intestino posterior y entre ellas presentaron interacciones positivas, lo que puede significar relaciones simbióticas entres estos grupos.

El ajo tiene un efecto similar al de los antibióticos, provocando disbiosis intestinal en el jurel cola amarilla, reduciendo la riqueza y abundancia de bacterias y modificando funciones en la microbiota intestinal.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbink W., Garcia AB., Roques JA., Partridge GJ., Kloet K, Schneider O. 2012. The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi* in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*. 330130-135.
- Abd El-Galil MA, Aboelhadid SM. 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Veterinary Parasitology*. 185(2-4): 57-63.
- Abdel-Tawwab M., Khalifa E., Diab AM., Khallaf MA., Abdel-Razek N, Khalil RH. 2020. Dietary garlic and chitosan alleviated zearalenone toxic effects on performance, immunity, and challenge of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, to *Vibrio alginolyticus* infection. *Aquaculture International* 28(2): 493-510.
- Adineh H., Harsij M., Jafaryan H, Asadi M. 2020. The effects of microencapsulated garlic (*Allium sativum*) extract on growth performance, body composition, immune response and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Journal of Applied Animal Research*. 48372-378.
- Aguilera E., Yany G, Romero J. 2013. Cultivable intestinal microbiota of yellowtail juveniles (*Seriola lalandi*) in an aquaculture system. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 41(3): 395-403.
- Ahmadniaye Motlagh H., Safari O., Selahvarzi Y., Baghalian A, Kia E. 2020. Non-specific immunity promotion in response to garlic extract supplemented diets in female Guppy (*Poecilia reticulata*). *Fish & Shellfish Immunology*. 9796-99.
- Akhter N., Wu B., Memon AM, Mohsin M. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish & Shellfish Immunology*. 45(2): 733-741.
- Alexander CP., Kirubakaran CJ, Michael RD. 2010. Water soluble fraction of *Tinospora cordifolia* leaves enhanced the non-specific immune mechanisms and disease resistance in *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 29(5): 765-772.
- Altinterim B, Aksu Ö. 2020. Effects of Garlic (*Allium sativum*, Limne) Oil Macerate, Tunceli Garlic (*Allium tuncelianum*, Kollman) Oil Macerate and Onion (*Allium cepa*, Limne) Oil Macerate on Antioxidant Enzyme Activities (CAT, GR GPx and MDA) of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*. 5(1): 61-65.
- Aly SM, Atti NMA. 2008. Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus* 8 th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 8277-296.
- Aly SM, Mohamed MF. 2010. *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 94(5): 31-39.
- Amagase H., Petesch BL., Matsuura H., Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*. 131(3s): 955s-962s.

- Ankri S, Mirelman D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*. 1(2): 125-129.
- Anthony JP., Fyfe L, Smith H. 2005. Plant active components - A resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*. 21(10): 462-468.
- Anton R. 2016. Les constituants spécifiques des Alliaceae. *Phytothérapie*. 14(3): 149-153.
- Armstrong LE., Casa DJ, Belval LN. 2019. Metabolism, bioenergetics and thermal physiology: influences of the human intestinal microbiota. *Nutrition research reviews*. 32(2): 205-217.
- Armuelles-Bernal C.E. 2022. Capacidad antihelmíntica del ajo contra *Zeuxapta seriolae* y su efecto en las variables productivas y sanguíneas del jurel *Seriola dorsalis*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 86 pp.
- Armuelles-Bernal C., Cucala-García L., Barón-Sevilla B., Díaz-Jiménez L., Rubio-Godoy M., Hernández-Rodríguez M. 2022. Effect of garlic extract and diallyl sulfide immersion baths in the life stages of *Zeuxapta seriolae*, a parasite of California yellowtail (*Seriola dorsalis*). *Aquaculture International*. 30(3): 1261-1277.
- Avilés-Quevedo A, Castello-Orvay F. 2004. Manual para el cultivo de *Seriola lalandi* (Pisces: Carangidae) en Baja California Sur, México. Instituto Nacional de Pesca, México.
- Awad E, Awaad A. 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 6740-54.
- Bairagi A., Ghosh KS., Sen SK, Ray AK. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*. 10(2): 109-121.
- Banerjee G, Ray AK. 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Research in Veterinary Science* 11566-77.
- Bayan L., Koulivand PH, Gorji A. 2014. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna journal of phytomedicine*. 4(1): 1-14.
- Bender-Bojalil D, Bárcenas-Pozos ME. 2013. El ajo y sus aplicaciones en la conservación de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 7(1): 25-36.
- Bernardet J. 2011. Family I. Flavobacteriaceae Reichenbach 1992. *Bergey's manual of systematic bacteriology*,. 4106-111.
- Bikel S., Valdez-Lara A., Cornejo-Granados F., Rico K., Canizales-Quinteros S., Soberón X., Del Pozo-Yauner L, Ochoa-Leyva A. 2015. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Computational structural biotechnology* 13390-401.
- Bjornsdottir-Butler K., Bowers JC, Benner Jr RA. 2015. Prevalence and characterization of high histamine-producing bacteria in Gulf of Mexico fish species. *Journal of food protection* 78(7): 1335-1342.
- Bokulich NA., Subramanian S., Faith JJ., Gevers D., Gordon JI., Knight R., Mills DA, Caporaso JG. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods*. 10(1): 57-59.
- Bolyen E, Rideout, J.R., Dillon, M.R. et al. 2019. Author Correction: Reproducible, interactive,

- scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 37(8): 852-857.
- Borlinghaus J., Albrecht F., Gruhlke MC., Nwachukwu ID, Slusarenko AJ. 2014. Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules*. 19(8): 12591-12618.
- Borrelli L., Aceto S., Agnisola C., De Paolo S., Dipineto L., Stilling RM., Dinan TG., Cryan JF., Menna LF, Fioretti A. 2016. Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish. *Scientific reports*. 6(1): 1-9.
- Breyer KE., Getchell RG., Cornwell ER., Wooster GA., Ketola HG, Bowser PR. 2015. Erratum to efficacy of an extract from garlic, *Allium sativum*, against infection with the *Furunculosis bacterium*, *Aeromonas salmonicida*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 46(3): 273-282.
- Bulfon C., Volpatti D, Galeotti M. 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research*. 46(3): 513-551.
- Butt RL, Volkoff H. 2019. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in endocrinology*. 109.
- Cahill MM. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial ecology* 1921-41.
- Callahan BJ., McMurdie PJ., Rosen MJ., Han AW., Johnson AJ, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*. 13(7): 581-583.
- Camacho C, Coulouris, G., Avagyan, V. et al. . 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 10(1): 1-9.
- Cámara-Ruiz M., Balebona MC., Moriñigo MÁ, Esteban MÁ. 2020. Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a fish health modulator: a review. *Microorganisms*. 8(12): 1990.
- Caporaso JG., Lauber CL., Walters WA., Berg-Lyons D., Lozupone CA., Turnbaugh PJ., Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*. 108(Supplement 1): 4516-4522.
- CONAPESCA. 2019. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- Cornuault JK., Byatt G., Paquet M-E., De Koninck P, Moineau S. 2022. Zebrafish: a big fish in the study of the gut microbiota. *Current Opinion in Biotechnology* 73308-313.
- Dai Z-L., Wu G, Zhu W-Y. 2011. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 16(5): 1768-1786.
- Dam CTM., Booth M., Pirozzi I., Salini M., Smullen R., Ventura T, Elizur A. 2020. Alternative feed raw materials modulate intestinal microbiota and its relationship with digestibility in Yellowtail Kingfish *Seriola lalandi*. *Fishes*. 5(2): 14.
- Darbyshire B, Henryf RJ. 1981. Differences in fructan content and synthesis in some *Allium* species. *New Phytologist*. 87249-256.
- de Voogd NJ., Cleary DFR., Polónia ARM, Gomes NCM. 2015. Bacterial community composition and predicted functional ecology of sponges, sediment and seawater from the thousand islands reef complex, West Java, Indonesia. *FEMS Microbiology Ecology*. 91(4).

- Dhanasiri AKS., Brunvold L., Brinchmann MF., Korsnes K., Bergh Ø, Kiron V. 2011. Changes in the intestinal microbiota of wild atlantic cod *Gadus morhua* L. Upon captive rearing. *Microbial Ecology*. 61(1): 20-30.
- Dhariwal A., Chong J., Habib S., King IL., Agellon LB, Xia J. 2017. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic acids research*. 45(W1): W180-W188.
- Dong P., Guo H., Huang L., Zhang D, Wang K. 2023. Glucose addition improves the culture performance of Pacific white shrimp by regulating the assembly of Rhodobacteraceae taxa in gut bacterial community. *Aquaculture*. 567739254.
- Douglas GM., Maffei VJ., Zaneveld J., Yurgel SN., Brown JR., Taylor CM., Huttenhower C, Langille MGI. 2019. PICRUSt2: An improved and customizable approach for metagenome inference. *BioRxiv*. 672295.
- Drago Serrano ME., López López M, Saínz Espuñes TDR. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 37(4): 58-68.
- Drobish AM., Emery BD., Whitney AM., Lauer AC., Metcalfe MG, McQuiston JR. 2016. *Oblitimonas alkaliphila* gen. nov., sp. nov., in the family Pseudomonadaceae, recovered from a historical collection of previously unidentified clinical strains. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 66(8): 3063-3070.
- Eirna-liza N., Saad CR., Hassim HA, Karim M. 2016. The effects of dietary inclusion of garlic on growth performance and disease resistance of African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings against (*Aeromonas hydrophila*) infection. *Journal of Environmental Biology*. 37(4): 817-824.
- El-Boshy ME., El-Ashram AM., Abdelhamid FM, Gadalla HA. 2010. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, beta-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 28(5-6): 802-808.
- Erguig M., Yahyaoui A., Fekhaoui M, Dakki M. 2015. The use of garlic in aquaculture. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 3(8): 28-33.
- Escobar-Briones L., Olvera-Novoa MA, Puerto-Castillo C. 2006. Avances sobre la ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 107-128.
- Estrada-De Los Santos P., Rojas-Rojas FU., Tapia-García EY., Vázquez-Murrieta MS, Hirsch AM. 2016. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Annals of Microbiology* 661303-1314.
- Etyemez Büyükdveci M., Balcázar JL., Demirkale İ, Dikel S. 2018. Effects of garlic-supplemented diet on growth performance and intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 486170-174.
- FAO. 2022. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2022. Hacia la Transformación Azul. FAO Rome, Italy.
- Fei Y., Huang S., Zhang H., Tong Y., Wen D., Xia X., Wang H., Luo Y, Barceló D. 2020. Response



of soil enzyme activities and bacterial communities to the accumulation of microplastics in an acid cropped soil. *Science of The Total Environment*. 707135634.

- Fjellheim AJ., Playfoot KJ., Skjermo J, 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.
- Foysal MJ., Alam M., Momtaz F., Chaklader MR., Siddik MAB., Cole A., Fotedar R, Rahman MM. 2019. Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) modulates gut microbiota and health status of tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture Research*. 50(8): 2107-2116.
- Francino M. 2016. Antibiotics and the human gut microbiome: dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in microbiology*. 61543.
- Fridman S., Sinai T, Zilberg D. 2014. Efficacy of garlic based treatments against monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Veterinary Parasitology*. 203(1-2): 51-58.
- Galindo-Villegas J., Garcíá-Moreno D., De Oliveira S., Meseguer J, Mulero V. 2012. Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(39): e2605-e2614.
- Gambogou B., Ameyapoh Y., Karou SD., Simpore J, Kokou A. 2018a. Effect of Aqueous garlic extract on biofilm formation and antibiotic susceptibility of multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates in Togo. *International Journal of Advanced Multidisciplinary Research*. 5(7): 23-33.
- Gambogou B., Ouattara A., Taale E., Karou S., Ameyapoh Y, Simpore J. 2018b. Garlic as alternative therapy to treat uropathogene bacteria in women with urinary tract infection in Lomé, Togo. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 5(12): 1-7.
- Ganguly S., Dora KC., Sarkar S, Chowdhury S. 2013. Supplementation of prebiotics in fish feed: A review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 23(2): 195-199.
- Ganguly S., Paul I, Mukhopadhyay S. 2010. Immunostimulant, probiotic and prebiotic—their applications and effectiveness in aquaculture: A Review. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 62(3): 130-138.
- Ganguly S, Prasad A. 2012. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 22(1): 11-16.
- Gbekley HE., D Karou S., Katawa G., Tchacondo T., Batawila K., Ameyapoh Y, Simpore J. 2018. Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants Used in the Management of Hypertension in the Maritime Region of Togo. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*. 15(1): 85-97.
- Gökalp F. 2018. The inhibition effect of garlic-derived compounds on human immunodeficiency virus type 1 and saquinavir. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 32(11): e22215-e22215.
- González Maza M., Guerra Ibañez G., Maza Hernández JC, Cruz Dopico A. 2014. Revisión bibliográfica sobre el uso terapéutico del ajo. *Revista Cubana de Medicina Física y*

Rehabilitación. 6(1): 61-71.

- Greco M. 2011. Estudio de procesos de deshidratación industrial de ajo con la finalidad de preservar alicina como principio bioactivo. pp. 1-60.
- Guo JJ., Kuo CM., Chuang YC., Hong JW., Chou RL, Chen TI. 2012. The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against *Streptococcus iniae* and on growth in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Aquaculture. 364-365:33-38.
- Guo JJ., Kuo CM., Hong JW., Chou RL., Lee YH, Chen TI. 2015. The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activities against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in Cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture. 435:111-115.
- Gupta A, Dhawan A. 2013. Probiotic based diets for freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Indian J Fish 60:103-109.
- Gysi DM., Voigt A., Fragoso TdM., Almaas E, Nowick K. 2018. wTO: an R package for computing weighted topological overlap and a consensus network with integrated visualization tool. BMC Bioinformatics. 19(1): 392.
- Hai NV. 2015. The use of probiotics in aquaculture. Journal of applied microbiology. 119(4): 917-935.
- Harikrishnan R., Kim JS., Kim MC., Dharaneedharan S., Kim DH., Hong SH., Song CY., Balasundaram C, Heo MS. 2012. Effect of dietary supplementation with *Suaeda maritima* on blood physiology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Miamiensis avidus*. Experimental Parasitology. 131(2): 195-203.
- Hensel KO., Boland V., Postberg J., Zilbauer M., Heuschkel R., Vogel S., Göttsche D., Wirth S, Jenke AC. 2014. Differential expression of mucosal trefoil factors and mucins in pediatric inflammatory bowel diseases. Scientific Reports 4(1): 7343.
- Heras J, Martin C. 2021. Nonadaptive radiation of the gut microbiome in an adaptive radiation of *Cyprinodon* pupfishes with minor shifts for scale-eating. BioRxiv 2021.01.06.425529.
- Hibbett D, Glotzer D. 2011. Where are all the undocumented fungal species? A study of *Mortierella* demonstrates the need for sequence-based classification. Where are all the undocumented fungal species? A study of *Mortierella* demonstrates the need for sequence-based classification. 191(3): 592-596.
- Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. Nature 444(7121): 860-867.
- Jakobsen TH., Van Gennip M., Phipps RK., Shanmugham MS., Christensen LD., Alhede M., Skindersoe ME., Rasmussen TB., Friedrich K., Uthe F., Jensen PØ., Moser C., Nielsen KF., Eberl L., Larsen TO., Tanner D., Højby N., Bjarnsholt T, Givskov M. 2012. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 56(5): 2314-2325.
- Karimi Pashaki A., Ghasemi M., Zorriehzahra J., Sharif Rohani M, Hosseini S. 2020. Effects of dietary garlic (*Allium sativum*) extract on survival rate, blood and immune parameters changes and disease resistance of Common carp (*Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758) against Spring Viremia of Carp (SVC). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 19(3): 1024-1039.

- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*. 30(4): 772-780.
- Kavitha C., Ramesh M., Kumaran SS, Lakshmi SA. 2012. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Experimental and Toxicology Pathology*. 64(7-8): 681-687.
- Kim A., Kim N., Roh HJ., Chun W-K., Ho DT., Lee Y, Kim D-H. 2019. Administration of antibiotics can cause dysbiosis in fish gut. *Aquaculture*. 512734330.
- Kim S-H., Ben-Gigirey B., Barros-Velázquez J., Price RJ, An H. 2000. Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. *Journal of Food Protection*. 63(2): 244-251.
- Klimpel S., Abdel-Ghaffar F., Al-Rasheid KAS., Aksu G., Fischer K., Strassen B, Mehlhorn H. 2011. The effects of different plant extracts on nematodes. *Parasitology Research*. 108(4): 1047-1054.
- Kozich JJ., Westcott SL., Baxter NT., Highlander SK., Schloss PDJA. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*. 79(17): 5112-5120.
- Krogdahl Å., Hemre GI, Mommsen T. 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture nutrition*. 11(2): 103-122.
- Langille MG., Zaneveld J., Caporaso JG., McDonald D., Knights D., Reyes JA., Clemente JC., Burkepile DE., Vega Thurber RL., Knight R., Beiko RG, Huttenhower C. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*. 31(9): 814-821.
- Leary SL., Underwood W., Anthony R., Cartner S., Corey D., Grandin T., Greenacre C., Gwaltney-Brant S., McCrackin M, Meyer R. 2013. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. American Veterinary Medical Association Schaumburg, IL.
- Lee JY., Gao Y. 2012. Review of the Application of Garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*. 43(4): 447-458.
- Lee DH., Lim SR., Han JJ., Lee SW., Ra CS, Kim JD. 2014. Effects of dietary garlic powder on growth, feed utilization and whole body composition changes in fingerling sterlet sturgeon, *Acipenser ruthenus*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 27(9): 1303-1310.
- Li M., Muthaiyan A., A O'Bryan C., E Gustafson J., Li Y., G Crandall P,C Ricke S. 2011. Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. *Current pharmaceutical biotechnology*. 12(8): 1240-1254.
- Lin H., Eggesbø M, Peddada SD. 2022. Linear and nonlinear correlation estimators unveil undescribed taxa interactions in microbiome data. *Nature communications*. 13(1): 4946.
- Lin S., Pan Y., Luo L, Luo L. 2011. Effects of dietary  $\beta$ -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish & Shellfish Immunology*. 31(6): 788-794.
- Liu J., Guo W., Yang M., Liu L., Huang S., Tao L., Zhang F, Liu Y. 2018. Investigation of the

- dynamic changes in the chemical constituents of Chinese “Laba” garlic during traditional processing. *RSC Advances*. 8(73): 41872-41883.
- Louca S., Polz MF., Mazel F., Albright MB., Huber JA., O’Connor MI., Ackermann M., Hahn AS., Srivastava DS, Crowe SA. 2018. Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature ecology evolution*. 2(6): 936-943.
- Lozupone C., Lladser ME., Knights D., Stombaugh J, Knight R. 2011. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal*. 5(2): 169-172.
- Macfarlane GT, Macfarlane S. 2012. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International* 95(1): 50-60.
- Magrone T., Fontana S., Laforgia F., Dragone T., Jirillo E, Passantino L. 2016. Administration of a polyphenol-enriched feed to farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) modulates intestinal and spleen immune responses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016.
- Manoppo Gpeogoc H., Kolopita MEF, Malatunduh R. 2016. Growth promoter effect of garlic (*Allium sativum*) on carp (*Cyprinus carpio* L). *International Journal of PharmTech Research*. 9(4): 283-288.
- Marin I, Arahal DR. 2014. The family beijerinckiaceae In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, eds. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Berlin: Springer. 115-133.
- McDonald R., Zhang F., Watts JEM, Schreier HJ. 2015. Nitrogenase diversity and activity in the gastrointestinal tract of the wood-eating catfish *Panaque nigrolineatus*. *The ISME Journal*. 9(12): 2712-2724.
- McMurdie PJ, Holmes S. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*. 8(4): e61217.
- Metwally MA. 2009. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of Fish Marine Sciences*. 1(1): 56-64.
- Michl SC., Ratten J-M., Beyer M., Hasler M., LaRoche J, Schulz C. 2017. The malleable gut microbiome of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Diet-dependent shifts of bacterial community structures. *PLoS One*. 12(5): e0177735.
- Militz TA., Southgate PC., Carton AG, Hutson KS. 2014. Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. *Journal of Fish Disease*. 37(5): 451-461.
- Mohebbi A., Nematollahi A., Dorcheh EE, Asad FG. 2012. Influence of dietary garlic (*Allium sativum*) on the antioxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*. 43(8): 1184-1193.
- Mosquera Rentería LM., Cardona Bermúdez LM., Passaro Carvalho C, Rivera Narváez CM. 2015. Probióticos y prebióticos en acuicultura. *Encuentro SENNOVA del Oriente Antioqueño*. 1(1): 31-57.
- Musa N., Wei LS., Seng CT., Wee W, Leong LK. 2008. Potential of edible plants as remedies of systemic bacterial disease infection in cultured fish. *Global Journal of Pharmacology*. 2(2): 31-36.

- Muzaffar F., Ansal MD, Dhawan A. 2017. Effect of garlic (*Allium sativum* L.) supplemented feed on survival and growth of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Indian Journal of Animal Nutrition*. 34(1): 91-98.
- Nayak SK. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*. 41(11): 1553-1573.
- Ndong D, Fall J. 2011. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research*. 3(1): 1-9.
- Nematollahi A., Decostere A., Pasmans F, Haesebrouck F. 2003. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of fish diseases*. 26(10): 563-574.
- Newaj-Fyzul A., Al-Harbi A, Austin B. 2014. Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*. 4311-11.
- Nya EJ, Austin B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease*. 32(11): 963-970.
- Nya EJ., Dawood Z, Austin B. 2010. The garlic component, allicin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 33(4): 293-300.
- Nyman A., Huyben D., Lundh T, Dicksved J. 2017. Effects of microbe- and mussel-based diets on the gut microbiota in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture Reports*. 534-40.
- Oosthuizen CB., Reid A-M, Lall N. 2018 Chapter 9 - Garlic (*Allium sativum*) and Its Associated Molecules, as Medicine. In: *Medicinal Plants for Holistic Health and Well-Being* (ed by Lall N). Academic Press, pp. 277-295.
- Orellana J., Waller U, Wecker B. 2014. Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. *Journal Aquacultural engineering*. 5820-28.
- Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B, Balcázar JL. 2018. Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. *Trends in Microbiology*. 26(11): 896-903.
- Pérez T., Balcázar J., Ruiz-Zarzuola I., Halaihel N., Vendrell D., De Blas I, Múzquiz J. 2010. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal immunology*. 3(4): 355-360.
- Price MN, Dehal, P. S., Arkin, A. P. 2010. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one*. 5(3): e9490.
- Qiao R., Sheng C., Lu Y., Zhang Y., Ren H, Lemos B. 2019. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Science of the Total Environment*. 662246-253.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J, Glöckner FO. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 41(D1): D590-D596.

- Raman RP. 2017. Applicability, Feasibility and Efficacy of Phytotherapy in Aquatic Animal Health Management. *American Journal of Plant Sciences*. 08(02): 257-287.
- Ramírez C., Rojas R, Romero J. 2020. Partial evaluation of autochthonous probiotic potential of the gut microbiota of *Seriola lalandi*. *Probiotics and antimicrobial proteins* 12672-682.
- Ramirez C, Romero J. 2017. The Microbiome of *Seriola lalandi* of Wild and Aquaculture Origin Reveals Differences in Composition and Potential Function. *Front Microbiol*. 81844.
- Ray A., Ghosh K, Ringø E. 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*. 18(5): 465-492.
- Raymann K., Shaffer Z, Moran NA. 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS biology*. 15(3): e2001861.
- Reshma K., Sumithra T., Nair AV., Raju VS., Kishor T., Sreenath K, Sanil N. 2018. An insight into the gut microbiology of wild-caught mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (forsskal, 1775). *Aquaculture*. 497320-330.
- Reverter M., Tapissier-Bontemps N., Sasal P, Saulnier D. 2017 Use of Medicinal Plants in Aquaculture. In: *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*, pp. 223-261.
- Rodríguez-Fonseca MA. 2014. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el comportamiento térmico y de alimentación de los juveniles de jurel cola amarilla *Seriola lalandi*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), pp. 1-71.
- Rodríguez F., Esteban M., Meseguer J., Bravo M., Gómez G., Rojas-Luna T., Jiménez G, Balcázar J. 2003. Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA, pp. 624-654.
- Romero J., Ringø E, Merrifield DL. 2014 The Gut Microbiota of Fish. In: *Aquaculture Nutrition*, pp. 75-100.
- Roquigny R., Novinscak A., Biessy A, Filion M. 2017 Pseudomonadaceae: From Biocontrol to Plant Growth Promotion. In: *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation* (ed by Mehnaz S). Springer Singapore, Singapore, pp. 39-68.
- Rubio Valladares L. 2016. Caracterización de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) de medio silvestre: comparación de métodos tradicionales versus métodos moleculares de identificación. Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Agronómicas Santiago, Chile
- Saddler G, Bradbury J. 2005 Family I. Xanthomonadaceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2 (The Proteobacteria), Part B (The Gammaproteobacteria). Berlin & Heidelberg, Germany: Springer.
- SAGARPA. 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Carta Nacional Acuícola. México. 81-83.
- SAGARPA. 2018. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Pesca. Publicada el 27 de marzo de 2018 en el Diario Oficial de la Federación.
- Saha M, Bandyopadhyay PK. 2017. Phytochemical screening for identification of bioactive compound and antiprotozoan activity of fresh garlic bulb over trichodinid ciliates affecting

ornamental goldfish. *Aquaculture*. 473181-190.

- Salas-Leiva J., Mazón-Suástegui JM., Teles A, Tovar-Ramírez D. 2020. Structure and predictive metabolic contribution of intestinal microbiota of Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles in aquaculture systems. *Molecular Biology Reports*. 479627-9636.
- Schaffer K. 2015. Epidemiology of infection and current guidelines for infection prevention in cystic fibrosis patients. *Journal of Hospital Infection*. 89(4): 309-313.
- Shakya SR, Labh SN. 2014. Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 2(4): 44-47.
- Shang A., Cao SY., Xu XY., Gan RY., Tang GY., Corke H., Mavumengwana V, Li HB. 2019. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*. 8(7).
- Shotts Jr E, Starliper C. 1999. Flavobacterial diseases: columnaris disease, cold-water disease and bacterial gill disease.
- Soffar SA, Mokhtar GM. 1991. Evaluation of the antiparasitic effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract in hymenolepiasis nana and giardiasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 21(2): 497-502.
- Solevåg AL., Zykova SN., Thorsby PM, Schmölzer GM. 2021. Metabolomics to diagnose oxidative stress in perinatal asphyxia: Towards a non-invasive approach. *Antioxidants*. 10(11): 1753.
- Soliman WS., Shaapan RM., Mohamed LA, Gayed SS. 2019. Recent biocontrol measures for fish bacterial diseases, in particular to probiotics, bio-encapsulated vaccines, and phage therapy. *Open veterinary journal*. 9(3): 190–195-190–195.
- Sorroza L. 2012. Propuesta de nuevas cepas probióticas para su uso en acuicultura. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España.
- Starliper CE. 2011. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research*. 2(2): 97-108.
- Stentiford GD., Neil DM., Peeler EJ., Shields JD., Small HJ., Flegel TW., Vlak JM., Jones B., Morado F., Moss S., Lotz J., Bartholomay L., Behringer DC., Hauton C, Lightner DV. 2012. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110(2): 141-157.
- Stevens DA., Hamilton JR., Johnson N., Kim KK, Lee J-S. 2009. *Halomonas*, a newly recognized human pathogen causing infections and contamination in a dialysis center: three new species. *Medicine*. 88(4): 244-249.
- Sullam KE., Essinger SD., Lozupone CA., O'Connor MP., Rosen GL., Knight R., Kilham SS, Russell JA. 2012. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular ecology*. 21(13): 3363-3378.
- Szychowski K., Rybczyńska-Tkaczyk K., Gaweł-Bęben K., Świeca M., Karaś M., Jakubczyk A., Matysiak M., Binduga U, Gmiński J. 2018. Characterization of Active Compounds of Different Garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 68(1): 73-81.

- Talpur AD, Ikhwanuddin M. 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*. 364-3656-12.
- Tapia-Paniagua ST., Chabrillon M., Diaz-Rosales P., de la Banda IG., Lobo C., Balebona MC, Morinigo MA. 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*. 60(2): 310-319.
- Thanikachalam K., Kasi M, Rathinam X. 2010. Effect of garlic peel on growth, hematological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in African catfish *Clarias gariepinus*(Bloch) fingerlings. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 3(8): 614-618.
- Torija ME., Matallana MC, Chalup N. 2013. El ajo y la cebolla: de las medicinas antiguas al interés actual. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural Sección Biológica*. 10729-37.
- Torrecillas S., Terova G., Makol A., Serradell A., Valdenegro V., Gini E., Izquierdo M., Acosta F, Montero D. 2019. Dietary phytochemicals and galactomannan oligosaccharides in low fish meal and fish oil-based diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: Effects on gut health and implications on *in vivo* gut bacterial translocation. *PLoS ONE*. 14(9): 1-31.
- Tran NT., Wang GT, Wu SG. 2017. A review of intestinal microbes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes). *Aquaculture Research*. 48(7): 3287-3297.
- Tran NT., Zhang J., Xiong F., Wang G-T., Li W-X, Wu S-G. 2018. Altered gut microbiota associated with intestinal disease in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 34(6): 1-9.
- Vallejo Villalobos JR., Peral Pacheco D, Carrasco Ramos MC. 2008. Las especies del género *Allium* con interés medicinal en Extremadura. *Medicina Naturista*. 2(1): 2-6.
- Vásquez-Piñeros M., Rondón-Barragan I, Eslava-Mocha PR. 2012. Imunoestimulantes em teleósteos :Probióticos, Beta-glucanas e LPS. Orinoquia -Universidade de los Llanos-Villavicencio, Meta. Colombia. 16(1): 46-62.
- Vázquez-Baeza Y., Pirrung M., Gonzalez A, Knight R. 2013. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience*. 2(1): 2047-2217X-2042-2016.
- Wang A., Ran C., Wang Y., Zhang Z., Ding Q., Yang Y., Olsen RE., Ringø E., Bindelle J, Zhou Z. 2019. Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade. *Fish & Shellfish Immunology*. 86734-755.
- Wang E., Yuan Z., Wang K., Gao D., Liu Z, Liles M. 2019. Consumption of florfenicol-medicated feed alters the composition of the channel catfish intestinal microbiota including enriching the relative abundance of opportunistic pathogens. *Aquaculture*. 501(October 2018): 111-118.
- Wu W., Jin Y., Bai F, Jin S. 2015 Chapter 41 - *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition) (ed. by Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J). Academic Press, Boston, pp. 753-767.
- Xing M., Hou Z., Yuan J., Liu Y., Qu Y, Liu B. 2013. Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*). *FEMS Microbiology Ecology*. 86(3): 432-443.



- Yang Z, Liao SF. 2019. Physiological effects of dietary amino acids on gut health and functions of swine. *Frontiers in veterinary science* 6169.
- Yun HM., Ban JO., Park KR., Lee CK., Jeong HS., Han SB, Hong JT. 2014. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacology & Therapeutics*. 142(2): 183-195.
- Zaineldin AI., Hegazi S., Koshio S., Ishikawa M., Bakr A., El-Keredy AM., Dawood MA., Dossou S., Wang W, Yukun Z. 2018. *Bacillus subtilis* as probiotic candidate for red sea bream: growth performance, oxidative status, and immune response traits. *Fish & shellfish immunology* 79303-312.
- Zhou J., Chen H., Ji H., Shi X., Li X., Chen L., Du Z, Yu H. 2018. Effect of dietary bile acids on growth, body composition, lipid metabolism and microbiota in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition* 24(2): 802-813.
- Zorriehzahra MJ., Delshad ST., Adel M., Tiwari R., Karthik K., Dhama K, Lazado CC. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary quarterly* 36(4): 228-241.