



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo**

**EVALUACIÓN DE DIETAS VEGETALES SUPLEMENTADAS
CON QUITOSANO SOBRE EL CRECIMIENTO, MORFOLOGÍA
Y MICROBIOTA INTESTINAL DE JUVENILES DE TILAPIA
ROJA *Oreochromis sp.***

Por:

Mesina Peña Alondra Abigail

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ACUACULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Alondra Abigail Mesina Peña la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Crisantema Hernández González
Directora de Tesis



Dra. María Cristina Chávez Sánchez
Integrante del comité de tesis



Dr. Carlos Abraham Guerrero Ruiz
Integrante del comité de tesis



Dra. Nayely Leyva López
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Evaluación de Dietas Vegetales Suplementadas con Quitosano sobre el Crecimiento, Morfología y Microbiota Intestinal de Juveniles de Tilapia Roja *Oreochromis sp*” 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 Alondra Abigail Mesina Peña, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. 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 manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



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


Dr. Pablo Weng González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mi posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán del posgrado en Ciencias Acuicultura y Manejo Ambiental por aceptarme en su programa de posgrados, llevar a cabo mis estudios de maestrías y permitirme desarrollar mi proyecto de tesis.

Al Fondo Mixto del Gobierno del Estado de Nayarit-CONACYT, proyecto FOMIX Clave NAY-2018-01-02-130685: “Desarrollo de un modelo productivo novedoso para el incremento de la competitividad y rentabilidad en sistemas de cultivo extensivo de tilapia en Nayarit”, a cargo de la Dra. Crisantema Hernández González, por el apoyo económico para la realización de esta investigación.

A mi directora de tesis, la Dra. Crisantema Hernández González, gracias por aceptarme en su equipo de trabajo y brindarme su apoyo y confianza para el desarrollo de este proyecto de tesis, mi mayor admiración y respeto para usted.

A los miembros de mi comité: Dra. María Cristina Chávez Sánchez, Dr. Carlos Abraham Guerrero Ruíz, Dra. Nayely Leyva López, por el gran aporte de su experiencia a este proyecto de tesis, me llevo demasiado aprendizaje, agradezco su paciencia, observaciones, recomendaciones y sugerencias que permitieron el enriquecimiento de este trabajo.

A la M. en C. Erika Yazmín Sánchez Gutiérrez por su apoyo técnico y metodológico en la formulación, elaboración de dietas y realización del bioensayo experimental.

A la Dra. María Cristina Chávez Sánchez y la M en C. Selene María Abad Rosales por su capacitación y apoyo técnico en las técnicas de análisis histológico.

A la M en C. María del Carmen Bolán y la M. en C. Julissa Enciso Ibarra, por su capacitación y apoyo en las técnicas para el análisis de microbiota intestinal.

Al Dr. Carlos Abraham Guerrero Ruíz y al Dr. Bruno Gómez Gil por la capacitación y apoyo en el análisis bioinformático de microbiota intestinal.

A mis compañeros de laboratorio, M en C. Daniela Arriaga, IBT. Elizabeth Cristerna, QFB. Melissa Peraza, M. en C. Baldomero Vizcarra, IBQ. Aldo Ulloa, M. en C. Andrés Galeana, y al M. en C. Erick Navarro, por su apoyo en el comienzo y final de bioensayo experimental, en biometrías

y muestreos, también agradezco mucho su amistad y disposición, es un placer trabajar con ustedes y contar con su apoyo y convivencia durante esta experiencia.

A mis compañeras de generación: Elizabeth, Blanca, Mariany y Eunice, agradezco enormemente su amistad, ánimos, por siempre tener una actitud de apoyo y acompañamiento.

A todos quienes en su momento fueron mis profesores y contribuyeron en el enriquecimiento de mi conocimiento.

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo y esfuerzo a mis padres, los pilares más fuertes en mi vida, Victoria Peña y Antonio Mesina gracias por su amor, paciencia, por creer en mí, por su apoyo a lo largo de mi carrera, por regalarme un hogar y los valores que hoy definen mi vida, son unos seres excepcionales que se preocupan por el bienestar de cada uno de sus hijos.

A todos mis hermanos, Abdiel, Jimena, Hugo, Álvaro y Arnold, por compartir e ir de la mano conmigo en el camino de la vida, cada uno es una pieza especial en esta gran familia, y vamos en la búsqueda de cumplir cada uno de nuestros sueños, gracias a Dios por tenerlos como hermanos.

A mi novio Miguel Lizárraga gracias por tu apoyo incondicional, es de gran importancia en mi vida, gracias por tu cariño, amor, apoyo y compañía me hacen muy feliz, gracias por estar en mi vida.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN CONSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	6
CONTENIDO.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE CUADROS.....	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1. Tilapia Roja <i>Oreochromis sp</i>	18
2.2. Uso de Dietas Altas en Vegetales y sus Efectos en Salud Intestinal.....	19
2.3. Quitosano.....	23
2.3.1. Características Fisicoquímicas del Quitosano.....	23
2.3.1.1. Estructura molecular.....	24
2.3.1.2. Peso molecular.....	25
2.3.1.3. Grado de acetilación	25
2.3.1.4. Solubilidad.....	25
2.3.2. Efecto del Quitosano en Crecimiento de Especies Acuícolas.....	26
2.3.3. Efecto del Quitosano en la Microanatomía Intestinal.....	27
2.3.4. Efecto del Quitosano en Microbiota Intestinal.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS.....	32
5.1. Objetivo General.....	32
5.2. Objetivos Específicos.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1. Área de Estudio.....	33
6.2. Obtención de Organismos.....	33
6.3. Diseño Experimental.....	33
6.3.1. Alimentación.....	34
6.3.2. Parámetros Fisicoquímicos.....	35
6.3.3. Biometrías.....	35
6.4. Formulación de Dietas Experimentales.....	35
6.5. Elaboración de dietas Experimentales	37

CONTENIDO (Continuación)

6.6. Análisis Proximales.....	39
6.6.1. Análisis de Humedad	39
6.6.2. Análisis de Proteínas.....	39
6.6.3. Análisis de Lípidos.....	39
6.6.4. Análisis de Ceniza.	40
6.7. Parámetros Zootécnicos.....	40
6.8. Índices Biológicos Corporales.....	41
6.9. Evaluación Histológica de la Microanatomía del Tejido Intestinal de Tilapia Roja <i>Oreochromis Sp.</i>	42
6.10. Evaluación Semicuantitativa de la Microanatomía del Tejido Intestinal.....	42
6.11. Evaluación de Microbiota Intestinal.....	43
6.11.1. Extracción de DNA Genómico Bacteriano con el Método de CTAB.....	43
6.11.2. Concentración y Purificación del DNA.....	44
6.11.3. Amplificación del Gen de la Región Variable V3 Gen 16S rRNA.	45
6.11.4. Purificación de los Producto de Amplificación 16s V3 16s rRNA con Perlas Magnéticas	45
6.11.5. Secuenciación Masiva.....	46
6.11.6. Análisis Bioinformático.....	46
6.11.6.1. Limpieza, ensamble y detección de quimeras.....	47
6.11.6.2. Análisis de OTUS.....	47
6.11.6.3. Análisis de predicción de vías metabólicas KEGG.....	47
6.12. Análisis Estadístico.....	48
7. RESULTADOS.....	49
7.1. Análisis de Composición Proximal Corporal.....	49
7.2. Evaluación de Parámetros Zootécnicos.....	49
7.2.1. Peso Ganado (PG).....	50
7.2.2. Tasa de Crecimiento (TC)	50
7.2.3. Tasa Específica de Crecimiento (TCE).....	51
7.2.4. Supervivencia (%S).....	51
7.2.5. Tasa de Conversión Alimenticia (TCA).....	51
7.3. Evaluación de Índices Corporales Somáticos.....	52
7.4. Evaluación Semicuantitativa de la Microanatomía del Tejido Intestinal de Tilapia Roja <i>Oreochromis sp.</i>	52
7.5. Evaluación en Microscopio Óptico de la Microanatomía del Tejido Intestinal.	54
7.6. Microbiota Intestinal de Tilapia Roja <i>Oreochromis sp.</i>	60
7.6.1. Secuenciación.....	60
7.6.2. Limpieza, Ensamble y Detección de Quimeras.	61
7.6.3. Asignación Taxonómica (OTUs).....	62
7.6.4. Rarefacción.....	62
7.6.5. Abundancia Relativa de la Comunidad Bacteriana Intestinal de la Tilapia Roja <i>Oreochromis sp.</i>	63

CONTENIDO (continuación)

7.6.6. Medidas de Diversidad Alfa de la Microbiota Intestinal de Tilapia Roja <i>Oreochromis sp.</i>	67
7.6.7. Diversidad Beta de la Microbiota Intestinal de Tilapia Roja <i>Oreochromis sp.</i>	68
7.6.8. Predicciones de la Composición Funcional en las Vías KEGG de la Microbiota Intestinal de la Tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i>	69
8. DISCUSIONES	74
9. CONCLUSIONES	83
10. RECOMENDACIONES	84
11. REFERENCIAS	85
12. ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tilapia roja (<i>Oreochromis sp.</i>)	18
2. Estructura molecular de la quitina y quitosano.....	24
3. Sistema experimental de cultivo de tilapia roja.....	34
4. Diagrama de flujo de la elaboración de las dietas experimentales en la planta de alimentos del CIAD, Unidad Mazatlán (Hernández et al., 2010).....	38
5. Corte longitudinal del intestino de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> Alimentada con dieta control alta en vegetal sin quitosano (HV, control).....	55
6. Corte longitudinal del intestino de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> alimentada con dieta baja en vegetal sin quitosano (LV).....	56
7. Corte longitudinal del intestino de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> alimentada con dieta alta en vegetal con 0.5% de quitosano (HV+0.5%QU).....	57
8. Corte longitudinal del intestino de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> alimentada dieta alta en vegetal con 1% de quitosano (HV + 1%).....	58
9. Corte longitudinal del intestino de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> alimentada con dieta alta en vegetal con 2% de quitosano (HV + 2%).....	59
10. Índice de rarefacción de la microbiota del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> a los 75 días de experimentación.	63
11. Abundancia relativa de los 15 principales fila presentes en las muestras de contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> después de 75 días de experimentación.	64
12. Abundancia relativa de las 15 principales familias presentes en muestras de del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> después de 75 días de experimentación.....	65
13. Heat-map de la abundancia a nivel familia de la microbiota del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> por tanque a los 75 días de experimentación.....	66
14. Índices de diversidad alfa: Índice de Shannon, observadas, chao1 y Ivnsimpson de la microbiota del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i>	67
15. Diversidad beta Bray-Curtis método NMDS con los datos agrupados (elipses) de la microbiota del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> de datos agrupados por dietas a los 75 días de experimentación.....	68

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

16. Diversidad beta Bray-Curtis método NMDS de la microbiota del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> de datos agrupados por dietas a los 75 días de experimentación.....	69
17. Predicciones PICRUSt de la composición funcional en las vías KEGG de nivel 2 de la microbiota intestinal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i>	70
18. Predicciones PICRUSt de la composición funcional en las vías KEGG de nivel 3 de la microbiota intestinal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> alimentadas con HV y LV.....	71
19. Predicciones PICRUSt de la composición funcional en las vías KEGG de nivel 3 de la microbiota intestinal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> alimentadas con HV+2%Q y LV.....	72
20. Predicciones PICRUSt de la composición funcional en las vías KEGG de nivel 3 de la microbiota intestinal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> alimentadas con HV+2%Q y HV.....	73
21. Grado 1 de inflamación linfocítica, Células dispersas en lámina propia, escasa distribución (estado normal).....	93
22. Grado 2 de inflamación linfocítica, mayor número de LF en lámina propia.	94
23. Grado 3 de inflamación linfocítica, mayor migración de LF a lámina propia y área de enterocitos.....	94
24. Grado 4 de inflamación linfocítica, Número difuso en lámina propia y sub-mucosa, engrosamiento LP.....	95
25. Grado 5 de inflamación linfocítica, LF distribuidas de forma densa en LP y SM, engrosamiento y deformidad de la LP, SM, y área de enterocitos.....	95

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales para tilapia roja <i>Oreochromis sp</i>	35
2. Análisis de composición proximal corporal de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> después de 75 días de experimentación (valores expresado en base húmeda)	49
3. Parámetros de crecimiento y eficiencia del alimento en tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> durante 75 días de experimentación.....	50
4. Evaluación de índices corporales somáticos de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> Después de 75 días de experimentación.....	52
5. Evaluación de grado de enteritis de tilapia roja <i>Oreochromis sp</i> de la sección intestinal proximal, alimentada con dietas altas en vegetales, puntaje promedio y sd.....	53
6. Evaluación de grado de enteritis de tilapia roja <i>Oreochromis sp</i> de la sección intestinal distal, alimentada con dietas altas en vegetales, puntaje promedio y sd.....	53
7. Resumen de signos presentados en la microanatomía intestinal de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> alimentada con dietas a base de ingredientes vegetales adicionadas con quitosano.....	60
8. Muestras de intestino de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> que fueron secuenciadas.....	60
9. Resumen del proceso de limpieza, ensamble y quimeras de las secuencias.....	61
10. Diferencias en la microbiota intestinal de tilapia roja <i>Oreochromis sp.</i> implementando ADONIS por pares, distancia de Bray-Curtis y corrección de Bonferroni.....	69
11. Sistema de puntuación semicuantitativa para los diferentes parámetros utilizados para evaluar el grado de enteritis desarrollada por el salmón del Atlántico alimentado con una dieta a base de harina de soja. Adaptado de Urán <i>et al.</i> 2008.....	91
12. Sistema de puntuación semicuantitativa de la severidad de infiltración de linfocitos en el tejido intestinal de la tilapia roja <i>Oreochromis sp</i>	92

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del quitosano en dietas a base de ingredientes vegetales sobre los índices zootécnicos y somáticos, morfología y microbiota intestinal de la tilapia roja (*Oreochromis sp.*). Se formuló una dieta base alta en ingredientes vegetales (HV control, 75% ingredientes vegetales), a la cual se le incluyó 0.5, 1 y 2% de quitosano (HV+0.5%Q, HV+1%Q, HV+2%Q), además de una dieta baja en vegetales (14% de vegetales) sin quitosano (LV). Las dietas se evaluaron por cuadruplicado en tanques de 70 L, colocando 15 organismos por tanque (peso inicial de 0.7 ± 0.016 g). Los organismos fueron alimentados durante 75 días. El peso ganado (PG), tasa de crecimiento (TC) y tasa de conversión alimenticia (TCA), fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) para los organismos alimentados con las dietas HV, HV+0.5%Q, HV+1%Q, HV+2%Q (PG= 21.39 ± 2.9 g, TCE= 4.58 ± 0.16 %/día y TCA= 1.30 ± 0.1 en promedio), en comparación con LV (PG= 11.16 ± 1.6 g, TCE= 3.75 ± 0.18 %/día y TCA= 1.69 ± 0.2 en promedio). En microanatomía intestinal se observaron signos de enteritis en las vellosidades del intestino proximal y distal en las dietas HV, HV+0.5%Q y LV, sin embargo se registró una disminución de esta patología en los grupos HV+1%Q y HV+2%Q. En la microbiota intestinal se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en donde HV y HV+2%Q tuvieron menor diversidad alfa (Shannon) conforme la dieta LV. El filo Fusobacteria fue el más abundante en los organismos alimentados con HV y HV+2%Q, mientras que Proteobacteria fue predominante LV. Mediante análisis PICRUSt, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las dietas HV y LV, en algunas vías KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) de nivel 2 y 3, como el metabolismo de la fructuosa, mannososa, amino azúcares, así como mayor actividad de las vías de glicólisis y gluconeogénesis. El presente trabajo demuestra adicionar quitosano en dietas altas en vegetales, no tiene influencia negativa en el crecimiento de la tilapia roja *Oreochromis sp.*, debido a que no resultaron diferentes las dietas altas en vegetales con y sin quitosano, tampoco muestra diferencias en la colonización de la microbiota intestinal, sin embargo, mejora las características de la microanatomía intestinal, al reducir patologías (inflamación linfocítica, ensanchamiento de lámina propia y sub-mucosa) generadas por ingredientes vegetales, por lo cual puede ser utilizado en dietas altas en vegetales, mejorando la salud intestinal de los peces en cultivo.

Palabras clave. Soya, microanatomía intestinal, microbiota intestinal, prebiótico.

ABSTRACT

The present study aims to investigate the effect of chitosan in diets based on plant ingredients on the zootechnical and somatic indices, intestinal microanatomy and gut microbiota of red tilapia (*Oreochromis sp.*). A high vegetable-based diet was formulated (HV, control, 75% vegetable ingredients) with inclusions of 0.5, 1, and 2% chitosan (HV+0.5%Q, HV+1%Q, HV+2%Q) and was formulated another low vegetable diet (14% vegetable ingredients) without chitosan (LV). The diets were evaluated in quadruplicate in 70-liter tanks with 15 organisms per tank (mean initial 0.7 ± 0.016 g). The organisms were feeding for 75 days. The weight gained (PG), growth rate (TC), and feed conversion rate (TCA) was significantly higher ($P < 0.05$) for organisms fed the HV, HV+0.5%Q, HV+1%Q and HV+2%Q diets (PG=21.39 $\pm$ 2.9g, TCE=4.58 $\pm$ 0.16%/day and TCA=1.30 $\pm$ 0.1 average), compared to LV (PG=11.16 $\pm$ 1.6 g, TCE=3.75 $\pm$ 0.18%/day and TCA=1.69 $\pm$ 0.2 average). Histological analysis showed signs of enteritis in the villi of the proximal and distal intestines in the HV, HV+0.5%Q, and LV diets, and a slight decrease in these pathologies were observed in the organisms fed with HV+1%Q and HV+2%Q. In the gut microbiota, significant differences were observed ($P < 0.05$) in HV and HV+2%Q had a lower alpha diversity (Shannon) according to the LV. The phylum Fusobacteria was the most abundant, in organisms fed high plant diets, while in the LV diet was Proteobacteria. Through PICRUSt analysis, significant differences ($P < 0.05$) were observed between the HV and LV diets, in some KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) level 3 pathways, such as the metabolism of fructose and mannose, metabolism of amino sugars, as well as increased activity of the glycolysis and gluconeogenesis pathways. The present work demonstrates that the inclusion of chitosan in high vegetable diets has no influence on the growth of red tilapia *Oreochromis sp.*, and does not show a difference in the colonization of the gut microbiota, however, it does improves the characteristics of the intestinal microanatomy, decrease the pathologies generated by diets high in vegetable ingredients, chitosan can be used to high vegetable diets, reducing the susceptibility to intestinal diseases of fish culture.

Keywords. Soy, intestinal microanatomy, intestinal microbiota, prebiotic.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es un sector que ha aumentado de forma constante a nivel mundial, en 2016 representó un 46.8% de la producción total de pescado para consumo humano, lo que supone un aumento respecto al año 2000, en donde representaba el 25.7% de producción total de peces. En 2016 se produjo un total de 54.1 millones de toneladas de peces de aleta y actualmente la demanda de esta producción va en aumento, y en consecuencia la intensificación de los cultivos acuícolas y crecimiento de este sector (FAO, 2018).

A nivel mundial, la tilapia es una de las especies más importantes en acuicultura, siendo la segunda especie más cultivada, debido a sus características zootécnicas, gran aceptación de una amplia variedad de alimentos y capacidad de producción intensiva (Fitzsimmons, 2010; FAO, 2018).

Tilapia es un término genérico para describir a los géneros y especies de la familia cichlidae, de los cuales *Oreochromis* es de mayor relevancia para fines acuícolas. Dentro de las especies de *Oreochromis* de interés productivo, la especie híbrida de tilapia (*Oreochromis sp.*), conocida como tilapia roja, destaca por ser una especie que presenta en primer lugar características organolépticas semejantes a especies de alto valor comercial como el pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* o al huachinango *Lutjanus campechanus* lo que incrementa su valor comercial. Es una especie adaptada a ambientes eurihalinos, soporta salinidades hasta de 35 ups que la hace apta para cultivos estuarinos (Mena-Herrera *et al.*, 2002; Kamal *et al.*, 2005; Fraga *et al.*, 2012).

Sin embargo, el éxito de un cultivo en gran medida depende del suministro de un alimento adecuado, el cual debe cumplir con los requerimientos nutricionales, contribuir a la salud y bienestar de la especie y en consecuencia mejorar el crecimiento y supervivencia de los organismos.

Otro punto importante es el costo que representa el alimento, equivalente desde un 50 hasta un 70% de los costos totales de una producción acuícola (Ramos-Pita, 2019). La disminución de este costo dependerá de que los ingredientes utilizados en las dietas sean sustentables y baratos, para que el cultivo sea rentable. La tilapia roja *Oreochromis sp.*, es una especie con hábitos omnívoros, lo cual favorece el uso de ingredientes de origen vegetal para su crecimiento (Shiau-Huang, 1989), los cuales son de menor costo, comparado con los ingredientes de origen animal marino, que usualmente se utilizan para la elaboración de alimentos en acuicultura.

Un obstáculo importante en el uso de ingredientes vegetales en dietas para peces, es que la presencia de una gran cantidad de antinutrientes, que pueden afectar la salud de los organismos, podrían inducir una variedad de cambios microanatómicos y funcionales en los tractos gastrointestinales los organismos acuícolas (Krogdahl *et al.*, 2015), tales como enteritis, acortamiento de pliegues en la mucosa, ensanchamiento de lámina propia, reducción de vellosidades intestinales, así como la reducción de diversidad microbiana intestinal (Kneifel-Domig, 2015; Zarkasi *et al.*, 2016). Estas alteraciones que originan una mala digestión, baja absorción de nutrientes, susceptibilidad a enfermedades y menor crecimiento de los organismos (Van den Ingh *et al.*, 1991; Baeverfjord *et al.*, 1996; Urán *et al.*, 2008).

La preocupación creciente por el efecto que tiene la alimentación en la salud de los peces en cultivo, hace que constantemente surjan nuevos alimentos o ingredientes funcionales que además de su valor nutricional, ofrezcan efectos funcionales benéficos para la salud y bienestar de los organismos (Domínguez-Vergara *et al.*, 2009; Montilla *et al.*, 2010).

Entre las estrategias nutricionales, está la inclusión de aditivos con diferentes propiedades funcionales, los cuales destacan entre otras funciones por: su influencia en el sistema inmune, proveen un mecanismo para subsanar las deficiencias y ejercen un efecto mitigante sobre los antinutrientes propios de los vegetales (Domínguez-Vergara *et al.*, 2009; Montilla *et al.*, 2010).

Los prebióticos, son ingredientes no digeribles por el organismo hospedero, estructuralmente están formados por oligo y/o polisacáridos, y tienen la funcionalidad de estimular el crecimiento selectivo de determinadas bacterias probióticas en la microbiota intestinal, ya que funcionan como sustrato para las mismas (Suárez, 2013). La microbiota intestinal influye en una gran variedad de procesos biológicos del huésped, incluyendo la digestión, inmunidad innata, proliferación de células epiteliales, así como la maduración estructural y funcional del intestino. Por lo cual es importante mantener un equilibrio de bacterias benéficas sobre las patógenas, ya que esto repercutirá en la salud intestinal de los organismos (Verschuere *et al.*, 2000; Bowler *et al.*, 2011).

En particular hay prebióticos de aislados de origen animal como los quito-oligosacáridos, que son muy abundantes y se pueden aprovechar de los residuos generados por las industrias de crustáceos. El subproducto de esta industria como los exoesqueletos y cabezas de camarón, que pueden ser aprovechados para la producción del quitosano, un quito-oligosacárido que puede ser utilizado como aditivo en dietas para peces. El quitosano se ha destacado por sus propiedades bioadhesivas y biocompatibles en las superficies epiteliales, al poder ligarse con superficies cargadas

negativamente como las superficies mucosas, por ejemplo el epitelio intestinal, en donde se ha demostrado que acelera el crecimiento de vellosidades intestinales, lo cual permite una mayor absorción de nutrientes y consecuentemente aumentar el crecimiento y supervivencia de los organismos en cultivo (Meshkini *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Zaki *et al.*, 2015; El-Sayed *et al.*, 2016).

El quitosano es un ingrediente funcional, que mejoraría la salud intestinal de los organismos en cultivo y que podría disminuir el impacto generado por las harinas vegetales en la microanatomía y microbiota del sistema intestinal. El intestino es el principal órgano de absorción de nutrientes y el mantenerlo en condiciones saludables, favorecerá el crecimiento y desarrollo de la tilapia roja (Martínez *et al.*, 2005).

Debido a que constantemente se busca mantener un balance entre la rentabilidad de un cultivo, la sustentabilidad y el bajo costo de los alimentos para tilapia, se incluyen ingredientes vegetales para la sustitución de harinas de pescado, evitando que una alta inclusión de ingredientes de origen vegetal provoque daños gastrointestinales como enteritis y afectaciones al rendimiento productivo. Lo anterior podría ser alcanzando usando ingredientes que favorezcan la salud intestinal de los peces, como el quitosano. Por esto en el presente trabajo se propone evaluar el efecto de la inclusión de quitosano en dietas con alta inclusión de ingredientes vegetales sobre los índices zootécnicos y somáticos, microanatomía y microbiota intestinal de la tilapia roja (*Oreochromis sp.*).

2. ANTECEDENTES

2.1 Tilapia roja *Oreochromis sp.*

La tilapia roja es un híbrido del género *Oreochromis*, atractivo al consumidor por sus características sensoriales, como su coloración y el sabor de su filete, es comparado con algunas especies de origen marino, lo que la convierten en una especie con alto valor comercial en el mercado y de gran importancia para la acuicultura (FAO, 2018).

La tilapia roja, taxonómicamente no responde a un nombre científico, ya que es un híbrido que resulta del cruzamiento de cuatro especies de tilapia, tres de ellas de origen africano y una cuarta israelita; (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mosambicus* x *Oreochromis urolepis hornorum* x *Oreochromis aureus*). El cruce selectivo permitió la obtención de un pez cuya coloración fenotípica puede ir desde el rojo cereza hasta el albino, con algunas manchas negras (Villarruel-Castillo *et al.*, 2011).

La fisiología de la tilapia, por lo general, presenta una forma ovalada y profunda (Figura 1), aunque podría cambiar de acuerdo al ambiente donde se desarrolla (FAO, 2017). Al igual que los demás miembros de la familia Cichlidae todas poseen largas aletas dorsales con 23 a 31 espinas y aleta caudal convexa (Catillo, 2001).



Figura 1. Tilapia roja (*Oreochromis sp.*)

Es una especie con hábitos omnívoros, su alimentación en ambientes naturales se basa por plantas superiores, detritos vegetales, algas, diatomeas, fitoplancton, fitobentos, macrofitas acuáticas, peces pequeños, crustáceos y bacterias, existiendo variación en cuanto a preferencias alimenticias según la especie (Morales, 1991), y en cautiverio se ha reportado que consume algas, zooplancton, vegetales acuáticos, bacterias (biofloc) y se adapta al consumo de alimentos artificiales. Es una especie eurihalinas, soportan hasta 36 ups, lo cual también la hace atractiva para su cultivo en zonas costeras (FAO, 2017).

2.2 Uso de Dietas Altas en Vegetales y sus Efectos en Salud Intestinal

El uso de ingredientes vegetales en las dietas de varias especies de peces, ha sido uno de los principales temas de investigación en la nutrición acuícola, debido a la reducción de las capturas de las especies marinas (como la sardina y atún) que sostienen la producción de harinas de pescado como ingrediente clave para la formulación de alimentos balanceados, por ello se busca reducir la dependencia de este ingrediente, con el uso de proteína de origen vegetal, que son de bajo costo y sustentables (Desai *et al.*, 2012; Oliva-Teles *et al.*, 2015).

Las harinas vegetales pueden ser utilizadas como reemplazo de las harinas de origen marino, por sus propiedades nutricionales y sustentabilidad: Los productos de la soya en forma entera o como harina desengrasada son utilizados en la alimentación de los peces. Por ejemplo, en dietas para salmónidos, bagre y tilapia, se han logrado formulaciones altas en ingredientes de origen vegetal, con reemplazos de entre un 70 a un 100% de las harinas de pescado, sin embargo, se ha observado que causan una gran cantidad de daños al sistema digestivo, debido a la presencia de antinutrientes presentes en estas harinas (Olvera-Novoa *et al.*, 2000).

Los antinutrientes son componentes endógenos de las plantas, tales como inhibidores de proteasas, lectinas, saponinas, ácido fítico, glucosinolatos y alcaloides que pueden perturbar la digestión y/o alterar la bioquímica, respuestas fisiológicas e inmunológicas en organismos que usan los ingredientes vegetales como fuentes nutritivas. En el contexto de la nutrición animal, se considera que generan efectos negativos porque pueden reducir la eficiencia de alimentación, causar depresión del crecimiento y degradar la salud e los organismos en general (Krogdahl *et al.*, 2015).

El uso de ingredientes vegetales afecta a especies con hábitos tanto omnívoros como carnívoros, diversos autores han descrito que la inclusión de soya mayor a un 30% en dietas para salmón *Salmo salar* (Van den Ingh *et al.*, 1991; Baeverfjord *et al.*, 1996; Nordrum *et al.*, 2000), trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Urán *et al.*, 2008) y pargo *L. guttatus* (Sánchez-Rodríguez, 2013), causan inflamación y acortamiento de vellosidades intestinales, ensanchamiento de lámina propia, y un aumento de permeabilidad en la zona distal intestinal, aunado a esto, generan problemas de desnutrición, susceptibilidad a enfermedades y menor crecimiento de las especies.

Así mismo se ha revelado que en especies con hábitos omnívoros e incluso herbívoros el uso de dietas con alto contenido vegetal, que supere la capacidad enzimática digestiva pueden causar problemas en la microanatomía intestinal; Por ejemplo, Urán *et al.* (2008), estudiaron la inclusión del 20% de harina de soya en dietas para la carpa común (*Cyprinus carpio*), una especie herbívora de agua dulce, los organismos presentaron patologías tales como: acortamiento de los pliegues de la mucosa, un aumento del número de células caliciformes, una lámina propia engrosada y enteritis intestinal.

Mahmoud *et al.* (2014), estudiaron el reemplazo total de harinas de pescado por harina de soya, en dietas para juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Los organismos (9.29 g), fueron alimentados durante 83 días. Los resultados reportados fueron patologías como enteritis, degeneración de la mucosa intestinal y menor crecimiento de la especie, en donde la dieta control tuvo un crecimiento de 32.6 g comparado con la dieta a base de soya de 14.69 g.

Lin *et al.* (2011), estudiaron el efecto de diferentes niveles de inclusión de harina de soya (0, 25, 50, 75 y 100%) en reemplazo de harinas de pescado en el crecimiento la tilapia híbrida *O. niloticus* x *O. aureus*. Al alimentar durante 8 semanas, los resultados indican que un reemplazo mayor al 75% de harina de soya reduce el crecimiento en esta especie de tilapia híbrida, en donde reportaron un peso final de 16 g en los organismos alimentados con la dieta a base de soya (100% de reemplazo) comparado con los organismos alimentados con la dieta control que tuvieron un peso final de 21.3 g.

El uso de altas inclusiones vegetales (40% a 100% de inclusión), no solo afecta la microanatomía intestinal como describen los estudios mencionados previamente, si no que afecta además la microbiota del contenido intestinal de las especies en cultivo. Por ejemplo; Desai *et al.* (2012), estudiaron el efecto de 3 diferentes dietas, con reemplazo del 30% de harinas de pescado, en el crecimiento y la microbiota intestinal de la trucha arcoíris (*O. mykiss*). La primera dieta fue

reemplazada con harina de soya, otra con inclusión de canola y la tercera dieta con inclusión de harina de chícharo. Estos autores observaron una disminución la diversidad de comunidades bacterianas, aumentando los filum de Proteobacterias, Firmicutes y Fusobacterias en los peces alimentados con las dietas de inclusión vegetal.

Wong *et al.* (2013), realizaron un estudio en trucha arcoíris (*O. mykiss*) alimentadas con dietas con harinas de pescado (control) y harinas a base de granos (soya, gluten de maíz, concentrado de soya y trigo) durante 10 meses. Los resultados mostraron ligeras diferencias en la abundancia de la microbiota del contenido intestinal, en donde la dominancia a nivel clase de bacterias en ambos grupos fue la siguiente: Bacilli (48.6%), Alphaproteobacteria (21.8%), Gammaproteobacteria (17.1%), Betaproteobacteria (3.8%), y Clostridia (2.2%).

Estruch *et al.* (2015), demostraron que la sustitución total de harina de pescado, por ingredientes vegetales (gluten de trigo, harinas de soya, chícharo, semillas de girasol y trigo) cambiaron la microbiota intestinal a nivel género en dorada (*Sparus aurata*) al alimentarlos durante 154 días, en donde Photobacterium fue el género dominante en las dietas a base de harinas de pescado, mientras que Streptococcus predominó en los organismos alimentados con las dietas altas en vegetales, aunque hubo un cambio en la estructura microbiana, A nivel de filo, en la dieta (control, con harinas de pescado), hubo mayor abundancia de Firmicutes (36.2%) y Proteobacterias (21.9%) mientras que en la dieta a base de vegetales hubo mayor abundancia de Proteobacterias (29.2%) seguido de Firmicutes (31.2%), los autores indican que la diversidad medida por Chao1, Shannon-Wiener y especies observadas, no se vio afecta por la sustitución de harinas de pescado.

Michl *et al.* (2017), estudiaron el reemplazo de 0%, 50% o 97% de harinas de pescado por harinas vegetales (soya, trigo, concentrado de chícharo, concentrado de colza, gluten de maíz y trigo), para la alimentación de trucha arcoíris (*O. mykiss*) durante 8 semanas, en el estudio se ve fuertemente afectada la microbiota intestinal por la inclusión de proteínas vegetales en la dieta, en donde muestra diferencias estadísticamente significativas de la comunidad intestinal bacteriana para los tres tipos de dieta, tanto a nivel de filum como de orden. Las proteínas vegetales de la dieta favorecieron significativamente la abundancia relativa de bacterias pertenecientes al orden de Lactobacillales, Bacillales y Pseudomonadales mientras que las proteínas animales en contraste significativamente promovieron la presencia de bacterias del orden: Bacteroidales, Clostridiales, Vibrionales, Fusobacteriales y Alteromonadales.

Wei *et al.*, (2018), reportaron que durante transición de hábitos de alimentación de zooplancton a

dietas herbívoras en besugo romo (*Megalobrama amblycephala*), hubo un cambio en la estructura microbiota en donde al alimentar con zooplancton la abundancia de la microbiota a nivel de filum fue dominada por Proteobacteria (34,71%), Firmicutes (29,38%), Fusobacteria (27,60%) y Tenericutes (4,90%), y al alimentar con dietas herbívoras fue dominado por Proteobacterias (61,43%), Firmicutes (21,24%), CKC4 (no clasificado) (6,77%) y Actinobacteria (5,67%), el perfil metabólico KEEG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Kanehisha, Goto, Sato, Furumichi, & Tanabe, 2012) de microbiota intestinal durante transición de hábitos de alimentación de zooplancton a dietas herbívoras, tiene influencia en las vías relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos (almidón y sacarosa, fructosa y manosa, glioxilato y dicarboxilato, ciclo del citrato, glucólisis / gluconeogénesis y pentosa fosfato).

Leyva-López *et al.* (2020), estudiaron el cambio de la estructura microbiana intestinal residente y transitoria del pargo flamenco (*L. guttatus*), alimentado con tres diferentes fuentes de proteína (animal terrestre, animal marino y mezcla de vegetales) durante 20 días. Los autores reportaron que la dieta a base de vegetales disminuyó significativamente la abundancia de Proteobacteria (64.6%) e incrementó ligeramente los filo Fusobacteria (26.25%) y Firmicutes (8.04%), reportaron que la diversidad (Shannon y OTUs observados) fue ligeramente menor en los organismos alimentados con dietas a base de proteínas vegetales, sin embargo no presentaron diferencias significativas en ninguna métrica de diversidad alfa de la microbiota intestinal residente y transitoria. También realizaron un análisis PICRUST, donde evaluaron las rutas KEEG para la predicción de respuestas funcionales de taxones bacterianos de las dietas evaluadas y reportaron que las vías relacionadas con metabolismo de aminoácidos ($p=5.79e-3$) y metabolismo de carbohidratos aumentaron significativamente en las bacterias pertenecientes al grupo alimentado con las dietas a base de vegetales en comparación con los grupos de las dietas de origen animal.

El uso de dietas con alto contenido de harinas vegetales (desde un 30% a un reemplazo total) en alimentos para peces, afecta la salud intestinal de los organismos, por lo que surge la necesidad de investigar sobre ingredientes que mitiguen los daños ocasionados por dietas altas en ingredientes vegetales, para la producción de alimentos rentables para la acuicultura. Esto se puede lograr mediante prebióticos, los cuales son ingredientes alimentarios no digeribles comúnmente constituidos por polisacáridos y oligosacáridos no amiláceos, que estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o más bacterias probióticas.

En particular los prebióticos de aislados de origen animal como los quito-oligosacáridos, son muy

abundantes y; se pueden obtener de los residuos generados por las industrias de crustáceos, diversos estudios han reportado variados efectos benéficos al adicionarlo en dietas para peces.

2.3 Quitosano

El quitosano es un quito-oligosacáridos funcional que ha sido utilizado en diferentes industrias tanto alimentaria, farmacéutica y biomédica, por la gran versatilidad que presenta en el organismo; es un derivado de quitina, el cual es un polisacárido muy abundante en la naturaleza, siendo el segundo oligosacárido más abundante después de la celulosa. La quitina es el componente principal en la estructura de crustáceos, insectos, algas, diatomeas, incluida la pared celular de algunos hongos (Sugimoto, 1999; Crini, 2005).

Diferentes industrias pesqueras que se dedican a la comercialización de crustáceos generan una gran cantidad de residuos, tales como exoesqueletos y cabezas (fuentes de quitina), que pueden ser utilizados para la producción de quitosano. En México se producen alrededor de 47 mil 664 toneladas de camarón, los principales productores son los estados de Sinaloa con producción de 19 mil 551 ton; seguido de Sonora y Nayarit con 12 mil 579 y 2 mil 844 ton. Aproximadamente el 40% de esta producción son residuos que puede ser revalorizados y de esta forma, aumentar el valor de la cadena productiva del camarón (CONAPESCA 2020).

2.3.1 Características Funcionales y Fisicoquímicas del Quitosano

El quitosano es un copolímero compuesto por unidades de: 2-acetilamina-2desoxi- β -D-(+) glucopiranososa y el 2-amino-2desoxi- β -D-glucopiranososa. Se obtiene a partir de la modificación química de la quitina, la cual es tratada con una solución alcalina concentrada y caliente, el polímero que se obtiene, posee un comportamiento marcadamente básico debido al grupo amino libre en su estructura, las condiciones de temperatura, presión, concentración y tiempo determinan el peso molecular del polímero y su grado de deacetilación (Parada *et al.*, 2004; Araujo *et al.*,

2016).

Las propiedades del quitosano dependen principalmente de la fuente de obtención y el método de preparación. Estos polímeros difieren entre sí por su distribución, masa molecular y grado de acetilación (Peniche, 2006). Entre las numerosas propiedades funcionales que se le han atribuido están: biodegradabilidad, biocompatibilidad, actividad antimicrobiana, actividad anti fúngica, entre otras. Estas propiedades funcionales han promovido su utilización a lo largo de los años en campos distintos como la agricultura, la industria alimentaria, farmacéutica y la medicina (Rinaudo, 2006).

2.3.1.1 Estructura molecular. Estructuralmente la quitina es un monopolisacárido, insoluble en solución acuosa, que presenta una estructura lineal compuesta de unidades repetitivas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidas por enlace glicosídicos del tipo β -(1 $\rightarrow$ 4), presenta en la posición C-2, un grupo acetamida ($\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{NH}_2$), y cuando esta es desacetilada se produce quitosano (Figura 2), el cual presenta múltiples aplicaciones. El producto de la N-desacetilación de la quitina (el quitosano) nunca es completa, por lo que estructuralmente el quitosano se encuentra formado por dos tipos de unidades estructurales; la N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina (Castañeda *et al.*, 2011).

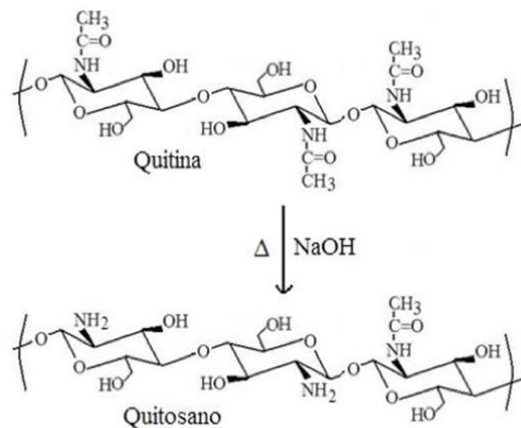


Figura 2. Estructura molecular de la quitina y quitosano.

2.3.1.2 Peso molecular. Para cualquier polímero, la solubilidad y la viscosidad dependen de su peso molecular, pero para el quitosano su efecto se extiende a sus propiedades biológicas, por lo que la determinación de su masa atómica adquiere una gran importancia. Si se logra conocer el peso molecular y la conformación de las moléculas del biopolímero, se pueden estimar una gran cantidad de propiedades reológicas y mecánicas, como su coeficiente de fricción y de sedimentación, además de su volumen hidrodinámico, entre otras (Kassai, 2000).

2.3.1.3 Grado de deacetilación. Primeramente, el grado de deacetilación permite diferenciar al quitosano de la quitina y determina sus propiedades químicas, físicas y biológicas, este parámetro además refleja el balance entre las unidades repetitivas 2-acetilamina-2desoxi- β -D-(+) glucopiranososa y el 2-amino-2desoxi- β -D-glucopiranososa.

Normalmente el quitosano comercial tiene un grado de deacetilación del 70 al 90% y en algunas aplicaciones biomédicas se utiliza con un grado de deacetilación mayor al 95%. En el caso del 70 al 90 % de grado de deacetilación, generalmente son para uso industrial comercial, entre los cuales se reporta, la elaboración de envases o recubrimientos, tratamientos de agua, hasta la formulación de alimentos para animales terrestres y marinos, ya que es el que se encuentra en el mercado de manera más común (Pérez *et al.*, 2014).

2.3.1.4 Solubilidad. La característica solubilidad depende del grado de deacetilación del quitosano, debido a su estructura, en donde presenta enlaces amino libres, al introducir el quitosano en estado sólido en una solución ácida se ionizan sus grupos amino con los iones H_3O^+ disponibles en la solución. Al protonarse los grupos amino el quitosano se convierte en un polielectrólito catiónico soluble con un valor pKa que ronda los 6.5. Físicamente sucede que, al estar ionizadas las aminas, estas son incapaces de formar puentes de hidrogeno con los ácidos carboxílicos del monómero siguiente, disminuyéndose el impedimento a la rotación. Adicionalmente, la molécula acetilo es más pesada que la amina y al reducirse la presencia de estas, se ofrece una mayor rotación estérica, incrementándose la flexibilidad de la cadena polimérica y facilitando que el quitosano pase a ser un fluido (Bajaj *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2019).

El quitosano presenta diversas propiedades funcionales que lo hacen un biomaterial muy versátil;

presenta mayor solubilidad en medios ácidos, es bioadhesivo y biocompatible en las superficies epiteliales al poder ligarse con superficies cargadas negativamente como las superficies mucosas (Giraldo, 2015).

2.3.2 Efecto del Quitosano en Crecimiento de Especies Acuícolas

Diversos estudios han demostrado que adicionar quitosano a las dietas de los peces provoca efectos significativos en crecimiento y supervivencia. En este contexto Shiau-Yu *et al.* (1999), evaluaron cuatro dietas con 30% de soya y 0, 2, 5 y 10% de inclusión de quitosano, durante 4 semanas; los autores reportaron que la adición dietética del 5 y 10% de quitosano, puede resultar contraproducente y causar reducción en el crecimiento de tilapia híbrida (*O. niloticus* x *O. aureus*), debido a que reduce los índices de digestibilidad lipídica, debido a la diferencia de cargas del quitosano (carga positiva) y los lípidos (carga negativa), lo que produce un efecto de atracción mutua. Así el quitosano atrapa y rodea la grasa impidiendo su digestión, por lo que recomiendan que la inclusión sea de 0 a 2% de quitosano ya que puede ser beneficioso según lo reportado por este y los siguientes estudios.

Meshkini *et al.* (2012), realizaron dietas para trucha arcoíris (*O. mykiss*) adicionadas con 0 (control), 0.25, 0.5 y 1% de inclusión de quitosano, alimentaron durante 8 semanas y observaron que los peces que consumieron las dietas adicionadas con 0.25 y 0.5% de quitosano presentaron una mayor resistencia al estrés y una reducción de mortalidad cuando fueron sometidas a estrés por salinidad (25 y 35ups).

Gopalakannan *et al.* (2006), evaluaron el efecto de la quitina, el quitosano y el levamisol en la respuesta inmune y el crecimiento de la carpa común *C. carpio*, al alimentar durante 90 días observaron mayor crecimiento en los peces alimentados con quitosano (94.92 ± 9.36 g) seguido de levamisol (93.25 ± 8.4 g) y quitina (63.54 ± 4.7 g), en comparación con los peces alimentados con la dieta no suplementada (47.31 ± 5.2 g).

Tirado-Osuna (2018), reportó que los organismos de *Centropomus viridis* alimentados con dietas con un 30% de reemplazo de harina de pescado por harina de soya adicionadas con 0.5% y 1% de quitosano, mostraron mayor crecimiento (83.12 ± 2.04 g) comparado con la dieta control

(69.47±2.25g), así como una disminución en la tasa de conversión alimenticia (TCA) con un resultado de 1.13 comparando con los peces que fueron alimentados con la dieta sin inclusión de quitosano (control) con una TCA de 1.82.

2.3.3 Efecto del Quitosano en la Microanatomía Intestinal

Se ha reportado que adicionar quitosano entre 0.5 y 4 % a una dieta base de 20% de harina de soya para carpa Gibel *Carassius auratus* (Chen *et al.*, 2014), lubina *Dicentrarchus labrax* (Zaki *et al.*, 2015), y pez blanco del caspio *Caspian kutum* (Kamali *et al.*, 2016), se reducen los daños ocasionados por los ingredientes vegetales en la microanatomía intestinal. Se ha reportado una mayor longitud de vellosidades y microvellosidades intestinales, menor grado de inflamación en lámina propia y submucosa: la salud de estos elementos es importante en el sistema gastrointestinal ya que son los órganos principales de absorción nutricional que traen consigo una mejora en el crecimiento y supervivencia de la especie en cultivo.

Los mecanismos de acción por los cuales el quitosano reduce el daño en el tejido intestinal causado por ingredientes vegetales no han sido dilucidados completamente; sin embargo, algunos autores mencionan que su actividad antimicrobiana en patógenos, disminuye las infecciones y ayuda a la proliferación de enterocitos. El posible mecanismo del efecto antimicrobiano es la interacción electrostática entre el quitosano cargado positivamente (poli-electrolito catiónico) y algunas bacterias con membranas celulares cargadas negativamente (Gram negativas como la *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus typhimurium*, entre otras), este altera significativamente las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismos y reduce la cantidad de bacterias patógenas en la microbiota (Chen *et al.*, 2014; Zaki *et al.*, 2015).

Otro mecanismo de acción que se ha reportado, es la interacción del quitosano con la matriz extracelular, ya que la estructura del quitosano posee cargas iónicas positivas que le permiten interactuar con moléculas cargadas negativamente como las superficies mucosas, en donde las glucosaminas interaccionan con los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular formando puentes de comunicación celular, dando estabilidad mecánica al tejido (Rianudo *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

2.3.4 Efecto del Quitosano en Microbiota Intestinal

La microbiota es un factor importante para la salud de los organismos, si la comunidad bacteriana es alterada, se influirá negativamente el estado fisiológico de los organismos, incluyendo la digestión, la inmunidad, el crecimiento y su desarrollo en general (Cruz-Leyva *et al.*, 2014; Haygood *et al.*, 2016).

Así mismo, la microbiota influye de forma directa sobre la nutrición y la salud de los organismos en general. Las funciones que la microbiota aporta al organismo son metabólicas, tróficas y protectoras. La función metabólica tiene como finalidad ayudar en los procesos de digestión y absorción de nutrientes para proporcionar energía al organismo, mientras que la función trófica fomenta el crecimiento y la diferenciación celular, además de estimular el sistema inmune del organismo. Su función protectora es debido a que actúa como la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos exógenos u oportunistas, creando el efecto de barrera (Guarner, 2007). Además, promueve el desarrollo de la mucosa intestinal, el cual provee al huésped protección en contra de la constante presencia de antinutrientes proveniente de los alimentos (Isolauri *et al.*, 2001).

Actualmente se acepta que los peces en general tienen una microbiota intestinal específica que se vuelve estable al llegar a la etapa adulta. En los peces de agua dulce los grupos dominantes presentes en el tracto gastrointestinal pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Pleisomonas*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* (Escobar-Briones *et al.*, 2006), mientras que en los peces marinos la microbiota está dominada por los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* (Cahil, 1990).

El quitosano es un oligosacárido, que posee funciones prebióticas, Hyeon-Woo *et al.* (2002) que el uso de quitosano, tiene un efecto en el incremento de *Bifidobacterium bifidum* en concentración de 0.2-0.4% de quitosano. Kong *et al.* (2014) muestra que el quitosano aumenta las especies bacterianas presumiblemente beneficiosas tales como *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium breve*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus spp.*, *Prevotella*, *Fusobacterium prausnitzii* y *Methanobrevibacter smithii*, mientras disminuyen las concentraciones de varios patógenos potenciales y concentraciones de amoníaco y ácidos grasos de cadena ramificada en el contenido luminal intestinal en mini-cerdos Huanjiang (*Sus scrofa*). Estos resultados demuestran que el quitosano estimula el crecimiento de algunas bacterias entéricas probióticas y que tiene un uso

potencial prebiótico.

Es muy poca bibliografía científica sobre el efecto del quitosano en la microbiota intestinal de peces, e incluso los resultados son muy inconsistentes en cuanto a la modulación microbiana, Chen *et al.* (2014) observaron que la adición en 1 y 2 % de quitosano en dietas para carpa Gibel (*C. auratus*), aumento la diversidad de la microbiota intestinal, en un periodo de alimentación de 50 días, favoreciendo el crecimiento de comunidades bacterianas de los fila Actinobacterias, Firmicutes y Fusobacterias, lo cual sugiere que el impacto del quitosano en la dieta sobre la comunidad bacteriana intestinal, podría estar relacionado con la dosis y el período de administración.

3. JUSTIFICACION

El cultivo de la tilapia roja *Oreochromis sp.*, presenta un potencial económico para las zonas costeras, sin embargo, se requiere el desarrollo de un alimento balanceado que incluya ingredientes vegetales sustentables y rentables para su alimentación, no obstante, las dietas altas en harinas vegetales pueden causar problemas en la salud gastrointestinal de los organismos, poniendo en riesgo el bienestar de esta especie.

Considerando lo anterior, el quitosano es un ingrediente, que presenta diversas cualidades funcionales, como su acción prebiótica y acelerar el crecimiento de vellosidades intestinales por su efecto cicatrizante y de regeneración de tejido, es por ello, que esta investigación se enfoca en evaluar el efecto del quitosano en dietas con alto contenido de ingredientes vegetales, tanto en rendimiento productivo, como en microanatomía y microbiota intestinal.

4. HIPÓTESIS

La inclusión de 0.5 a 2% de quitosano en dietas altas en vegetales para tilapia roja *Oreochromis sp.*, cultivada en condiciones de agua de mar, promueve el crecimiento, disminuye las alteraciones microanatómicas causadas por la alta inclusión de harinas vegetales y aumenta la diversidad de la microbiota intestinal.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de dietas a base de ingredientes vegetales adicionadas con quitosano sobre los índices zootécnicos y somáticos, microanatomía intestinal y microbiota de juveniles de tilapia roja *Oreochromis sp.*

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar los índices zootécnicos y somáticos de la tilapia roja alimentada con dietas altas en vegetales con diferentes inclusiones de quitosano.
2. Evaluar la salud de la microanatomía intestinal de la tilapia roja alimentada con dietas altas en vegetales adicionadas con quitosano.
3. Evaluar la microbiota del contenido intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.*, alimentada con dietas altas en vegetales adicionadas con quitosano, por medio de un análisis metagenómico de la región V3 del gen 16S rRNA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de Estudio

El presente trabajo se realizó en la Planta de alimentos, Laboratorio de Nutrición, Laboratorio de Bacteriología y Genómica, Laboratorio de Histología y Planta de peces, instalaciones ubicadas en el Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo (CIAD A.C.), Unidad Mazatlán, coordinación en Acuicultura y Manejo Ambiental, localizado en Av. Sábalo-Cerritos s/n. Estero del Yugo, Mazatlán, Sinaloa, México.

6.2 Obtención de Organismos.

Un lote de 600 organismos de tilapia roja *Oreochromis sp.*, fue obtenido de la empresa de producción de alevines de tilapia, Productos pesqueros de Topolobampo S.A. de C.V. ubicada en Topolobampo Sinaloa, y fueron transportados en un tanque (marca Rotoplas) de 450 L con aireación constante y a una temperatura de 18°C a las instalaciones de la Planta de peces de CIAD Unidad Mazatlán.

6.3 Diseño Experimental.

El sistema experimental se conformó de 20 tanques de fibra de vidrio, color blanco, con capacidad de 70 litros cada uno (Figura 3). El sistema se mantuvo con aireación constante y en recambio constante de agua de mar, a un flujo de 0.17 L min^{-1} , bombeada desde playa Las brujas, Mazatlán. Cada tanque fue cubierto con malla sombra para evitar la pérdida de organismos y/o evitar la exposición a posibles depredadores, los tanques se mantuvieron con aireación y recambio contante

de 0.17 L min^{-1} de agua de mar, con condiciones de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto de $30.3 \pm 1.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $34.6 \pm 0.4 \text{ ups}$, y $5.42 \pm 0.82 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.



Figura 3. Sistema experimental de cultivo de tilapia roja.

En cada tanque se colocaron 15 organismos con peso promedio inicial de $0.7 \pm 0.016 \text{ g}$. Cada dieta se evaluó con 4 réplicas durante un periodo de 75 días. Se realizaron biometrías cada 15 días, para el monitoreo de parámetros zootécnicos de todas las unidades experimentales y el ajuste de alimentación de acuerdo a la biomasa. Se realizó un sorteo al azar sin reemplazo para la distribución de las dietas por tanque y se marcaron para su identificación.

6.3.1 Alimentación.

Los organismos fueron alimentados cuatro veces por día, con los siguientes horarios: 8:00 am, 11:00 pm, 1:00 pm y 4:00 pm, al 10% de biomasa presente en cada tanque, ración dividida en tres porciones al día (8:00am, 12:00pm y 4:00pm) durante 75 días. Diariamente se registró el alimento consumido, las mortalidades, cambios de comportamiento y signos patológicos.

6.3.2 Parámetros Fisicoquímicos.

Diariamente se monitorearon los parámetros fisicoquímicos con un Oxímetro YSI 45 y un refractómetro ATAGO s/Mill-E; registrando diariamente la temperatura, oxígeno disuelto y salinidad.

6.3.3 Biometrías.

Las biometrías fueron realizadas cada 15 días para la evaluación de parámetros zootécnicos. Para evitar el estrés durante los muestreos, los peces fueron sedados con esencia de clavo disuelta al 10% con alcohol étílico de 70°, en una dosis de 0.5 mL L⁻¹ de agua de mar, se utilizaron redes y paños húmedos durante la manipulación, para evitar la pérdida de mucus y escamas de los organismos, se pesó cada organismo en una balanza analítica con precisión de ± 0.1 g.

6.4. Formulación y Elaboración de Dietas Experimentales

Se formularon cinco dietas isoproteicas (39%) e isolipídicas (10%); una alta en vegetales sin quitosano (HV, control), una baja en vegetales sin quitosano (LV) y tres dietas altas en vegetales con diferente inclusión quitosano (HV+0.5%Q, HV+1% Q, HV+2% Q) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales para tilapia roja *Oreochromis sp.*

INGREDIENTES (g/100g)	HV	HV + 0.5%Q	HV + 1%Q	HV + 2%Q	LV
Harina de subproductos de pescado (atún) ^a	7.00	7.00	7.00	7.00	23.00
Pasta de soya	43.00	43.00	43.00	43.00	0.00
Pulido de arroz	3.00	3.00	3.00	3.00	0.00

Harina de trigo	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
Harina de carne y hueso	4.00	4.00	4.00	4.00	35.00
Harina de sorgo	8.00	8.00	8.00	8.00	0.00
Hidrolizado de subproductos pesqueros	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Gluten de maíz	14.00	14.00	14.00	14.00	10.00
Aceite vegetal	2.48	2.48	2.48	2.48	0.00
Lecitina de soya	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40
Aceite de pescado	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
Fosfato dicálcico	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Alginato	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
^a Pre-mezcla vitaminas y minerales	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamina c	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Lisina	0.05	0.05	0.05	0.05	0.00
Metionina	0.20	0.20	0.20	0.20	0.00
Taurina	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Carotenoides	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Fitasa	0.005	0.005	0.005	0.005	0.000
Cloruro de colina	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Antioxidante	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Celulosa	5.08	4.58	4.08	3.08	20.82
^b Quitosano	0	0.5	1	2	0
Total	100	100	100	100	100
Composición proximal (%) base seca					
Proteína cruda	39.43	39.95	39.68	39.96	39.15
Lípidos	10.86	10.8	10.74	10.57	10.3
Cenizas	9.24	9.59	9.52	9.7	22.8
Humedad	8.09	8.28	8.05	8.17	6.36
Extracto libre de nitrógeno (ELN)	32.38	31.38	32.01	31.6	21.36
^c Energía cruda (Mcal/kg)	479.02	476.72	475.65	475.65	420.367

HV=dietas altas en vegetales (High vegetable), QNO= Quitosano, LV= dieta baja en vegetal (Low vegetable). ^a Pre-mezcla de vitaminas kg⁻¹: vitamina A, 2400 mg g⁻¹; vitamina D3, 2250 mg g⁻¹; vitamina E, 160 g; vitamina K3, 8,00 g; vitamina B1, 20.00 g; vitamina B2, 40,00 g; ácido pantoténico, 60,00 g; ácido nicotínico, 160,00 g; vitamina B6, 16,00 g; ácido fólico, 4,00 g; vitamina B12, 80 mg; biotina, 500 mg. Pre-mezcla de minerales kg⁻¹: manganeso, 100 g; zinc, 160 g; hierro, 200 g; cobre, 20 g; yodo, 5 g; cobalto, 0.60 mg. ^b marca VEPINSA S.A. de C.V. Grado alimenticio, grado de desacetilación 85%, peso molecular 280000 a 35000 kDa. ^c Energía cruda (Mcal/kg)=5,7cal*PB+9.4*LB+4.7*ELN.

6.5. Elaboración de las Dietas Experimentales

Como se muestra en Figura 3, se siguió el protocolo de la Planta de Alimentos de CIAD, Unidad Mazatlán (Hernández *et al.*, 2010), en donde se formularon y elaboraron las siguientes dietas experimentales.

El proceso comenzó moliendo todas las harinas en el molino de martillo marca micrón para obtener a tamaño de partícula de 250µm de todas las harinas que se utilizaron en la elaboración de las dietas. Posteriormente, se pesaron los ingredientes, de acuerdo con la formulación de las dietas, en una balanza Torrey EQB 50/100 Kg con precisión de 0.1 g y los micro-ingredientes se pesaron en una balanza Mettlet PM 488-Delta Ranger con precisión de 0.01 g.

Posteriormente se homogeneizaron los macro-ingredientes, que incluye todas las harinas y se mezclaron por un periodo de 30 minutos, después se incorporan lo micro-ingredientes y se siguió mezclando por un periodo de 10 minutos, posteriormente se adicionaron los aceites (10 minutos de mezcla) y agua hasta obtener una mezcla pastosa, esta mezcla se realizó en una mezcladora Kitchen Aid de 5L de capacidad. La mezcla resultante se colocó en un molino de carne Tor-rey con un dado de 2mm de apertura para peletizar el alimento.

Los pellets se cortaron manualmente, se colocaron en charolas de aluminio y se secaron en un horno de secado por convección a 40°C durante 8 horas, hasta que presentaron una humedad de 8% aproximadamente en todas las dietas, la humedad se estuvo monitoreando después de 5 horas por medio de una termobalanza Sartorius MA35.

Las dietas secas se cortaron, y se tamizaron para obtener un tamaño de pellet de 3mm, posteriormente fueron designados a su respectivo contenedor hermético etiquetado y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

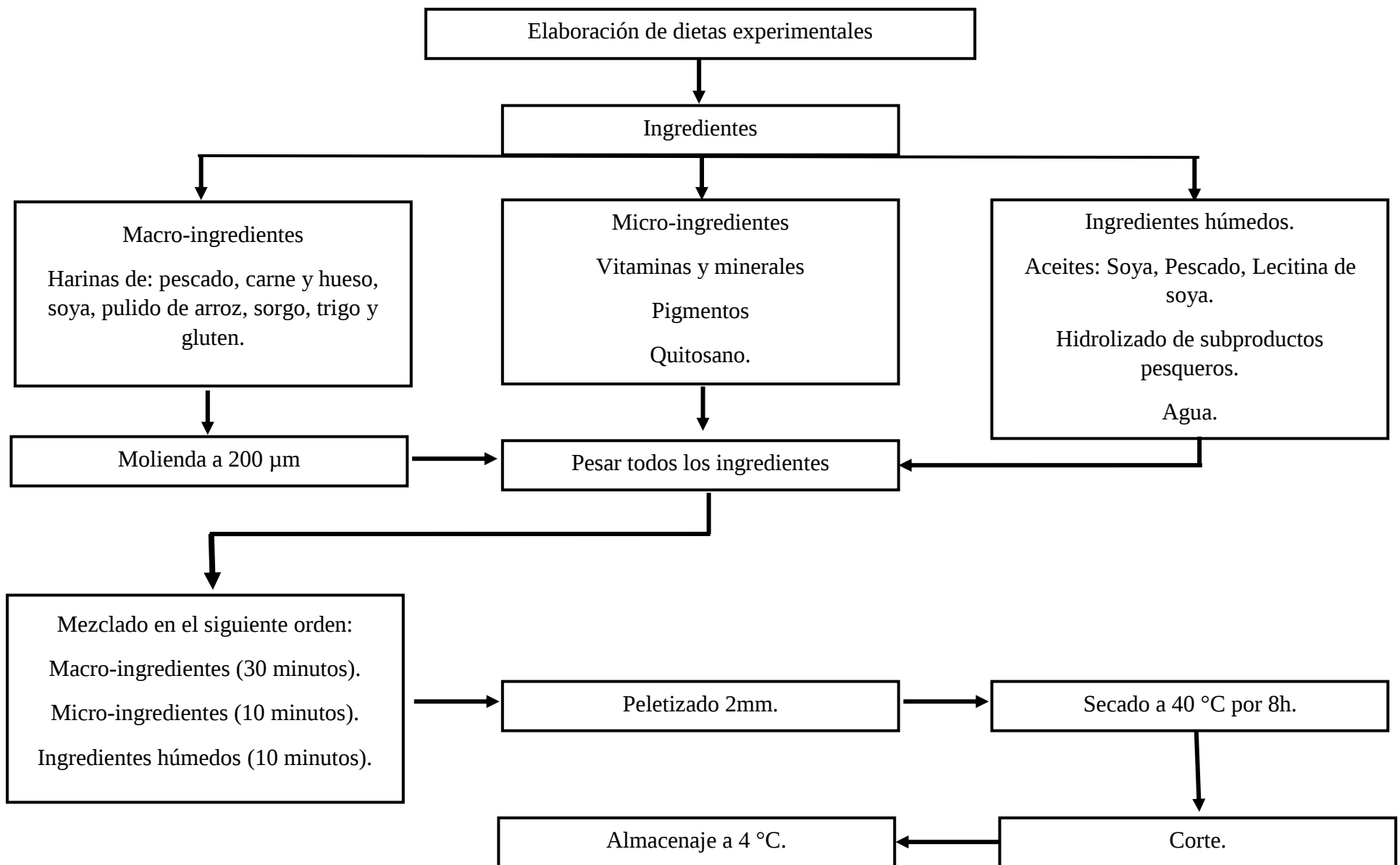


Figura 4. Diagrama de flujo de la elaboración de las dietas experimentales en la planta de alimentos del CIAD, Unidad Mazatlán (Hernández *et al.*, 2010).

6.6. Análisis Proximales

Los análisis de caracterización proximal de los ingredientes, dietas, y composición corporal inicial y final de los organismos experimentales, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bromatología del CIAD Unidad Mazatlán en el área de Nutrición de peces y crustáceos siguiendo las técnicas estandarizadas (AOAC, 2011).

6.6.1 Análisis de Humedad

La cantidad de humedad fue determinada por el método gravimétrico “Perdida en el secado de alimentos” AOAC 4.1.06, 2011. Utilizando un horno de secado (SHEL-LAB, Ce5G, Cornelius, OR, USA) en donde se introdujeron las muestras a 105°C durante un periodo de 5 horas.

6.6.2 Análisis de Proteínas

El análisis de proteína se llevó a cabo por el método de Micro-Kjeldahl AOAC 12.7.07 2011, utilizando un equipo de digestión y destilación (LABCONCO 65000, LABCONCO CORPORATION, USA).

6.6.3 Análisis de Lípidos

El análisis de la cantidad de grasas se realizó por el método Soxhlet 4.5.05, AOAC 2011, utilizando éter de petróleo como solvente en el equipo automático Soxhlet (FOSS Sox-Tec 2050, Soxhlet Avanti 2050, USA).

6.6.4 Análisis de Ceniza.

Para determinar el contenido de ceniza se utilizó el método de calcinación a 550°C durante 6 horas en una mufla (Fisher Scientific International, Inc. Pittsburgh, PA, USA) Por el método AOAC 32.1.05, AOAC 2011.

6.7 Parámetros Zootécnicos.

Los parámetros zootécnicos se registraron cada 15 días, para conocer el crecimiento y supervivencia de los organismos, los parámetros analizados fueron los siguientes:

Peso ganado (g):

$$PG = \text{Peso promedio final (g)} - \text{Peso promedio inicial (g)}$$

Tasa de crecimiento (%):

$$TC = \frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Peso inicial promedio (g)}} \times 100$$

Tasa específica de crecimiento (%/día):

$$TEC = \frac{\ln \text{Peso final (g)} - \ln \text{Peso inicial (g)}}{\text{número de días}} \times 100$$

Supervivencia (%):

$$S = \frac{\text{Numero de organismos final}}{\text{Numero de organismos inicial}} \times 100$$

Tasa de conversión alimenticia (TCA):

$$TCA = \frac{\text{Alimento consumido (g)}}{\text{Peso ganado (g)}}$$

Tasa de eficiencia proteica (PER):

$$PER = \frac{\text{Incremento en peso (g)}}{\text{Proteína Consumida (g)}}$$

6.8 Índices Biológicos Corporales.

Al finalizar el bioensayo se tomaron 4 organismos por unidad experimental, los cuales se sacrificaron por sobredosis (0.75mL L^{-1}) de esencia de clavo. Se midió el peso y talla corporal, fueron eviscerados para medir el peso total visceral, peso de hígado y grasa intraperitoneal de los mismos. Los índices biológicos se obtuvieron utilizando los datos registrados, siguiendo las siguientes ecuaciones:

Factor de condición (FC):

$$FC = \frac{\text{peso total del cuerpo (g)}}{(\text{Longitud total del cuerpo (cm)}^3)} \times 100$$

Índice viscerosomático (IV):

$$IV = \frac{\text{peso total de vísceras (g)}}{\text{peso total del cuerpo (g)}} \times 100$$

Índice hepatosomático (IH):

$$IH = \frac{\text{peso total de hígado (g)}}{\text{peso total del cuerpo (g)}} \times 100$$

Índice de grasa intraperitoneal (GI):

$$GI = \frac{\text{peso total húmedo de grasa (g)}}{\text{peso total del cuerpo (g)}} \times 100$$

6.9 Evaluación Histológica de la Microanatomía del Tejido Intestinal de Tilapia Roja *Oreochromis Sp*

Los análisis histológicos de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de histopatología de peces del CIAD Unidad Mazatlán.

La histología es el método diagnóstico que permite un panorama general del estado de salud intestinal de los organismos, para la determinación de la microanatomía normal y patológica se tomaron 6 organismos de muestra al inicio del bioensayo para su evaluación intestinal y al final del bioensayo (75 días después) se tomaron dos organismos por unidad experimental, teniendo una $n=8$ organismos de muestra por tratamiento.

Cada pez seleccionado aleatoriamente fue sacrificado con sobredosis de clavo (PMQ, Proquimery). Se realizó disección peritoneal para extraer el intestino y fijarlo inmediatamente de manera individual en 10% de formalina (100 mL formaldehído 37–40 %; 900 mL agua de mar; 4.0 g fosfato de sodio monobásico y 6.5 g de fosfato de sodio dibásico). Las muestras fueron sometidas a una deshidratación gradual de alcohol etílico (70, 80, 96 100%) y después fueron embebidos en parafina, para su posterior corte con el uso de un micrótopo. Se realizaron cortes longitudinales del intestino anterior y posterior de 5µm en un micrótopo rotatorio (Jung Histocut Leica #820), los cortes obtenidos se tiñeron por la técnica de hematoxilina-eosina para la diferenciación de los componentes del tejido (Lee y Luna 1968; Drury y Walington 1980; Kamonporn et al. 1999). Los cortes fueron analizados bajo un microscopio OLYMPUS (CH-30RF100, Japón) y las fotografías tomadas con una cámara Micropublisher 3.3 (Olmaging, Canadá).

6.10 Evaluación Semicuantitativa de la Microanatomía del Tejido Intestinal.

Las alteraciones intestinales se evaluaron semicuantitativamente en función de los criterios publicados por Urán *et al.*, 2008 en el cual describe las patologías y el grado de severidad presentado en el tejido intestinal causado por alimentación con dietas altas en harina de soya (Cuadro 11, Anexo 1), este sistema de puntuación semicuantitativa se utilizó para sección anterior

y posterior, con excepción de las vacuolas supranucleares ya que estas solo se presentan en la sección posterior intestinal. Para los resultados obtenidos de la evaluación semicuantitativa, de pliegues de la mucosa (PM), Células Goblet (CG), Gránulos Eosinófilos (EG), Lamina Propia (LP) y Mucosa Sub-epitelial (MS), para la puntuación semicuantitativa de los grados de inflamación linfocítica (LF, Linfocitos) se utilizó el sistema de puntuación semicuantitativa en tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con dietas altas en vegetales observadas en este estudio (Cuadro 12 y Figuras 21-25., Anexo 2).

6.11 Evaluación de Microbiota Intestinal

El proceso de toma de muestra y extracción de ADN se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología de CIAD Unidad Mazatlán.

Los peces se alimentaron por la mañana (8:00 am) y después de 30 min se tomaron 4 peces por unidad experimental los cuales fueron sedados con esencia de clavo al 0.5% y después se aplicó sobredosis de clavo para su muerte. Posteriormente bajo condiciones asépticas, se realizó una disección completa del área peritoneal y se extrajo la sección distal del intestino.

Las muestras se colocaron en un microtubo de 2 mL con etanol al 96% y se almacenó a -20 °C.

6.11.1 Extracción de DNA Genómico Bacteriano con el Método de CTAB

La extracción de ADN genómico bacteriano del contenido intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* se realizó por el método de buffer Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB):

1. En una campana de flujo laminar, con el área aséptica, se extrajo la sección intestinal del microtubo de 2 mL, se cortó la sección de forma longitudinal para extraer el contenido intestinal (heces), el cual se colocó en un microtubo estéril de 1.5 mL.
2. Posteriormente se agregaron 350 µL de buffer CTAB a cada muestra.
3. Se agregó 20 µL de proteinasa K en una concentración de 20 mg/mL y se agitó brevemente.

4. Los microtubos se colocaron en un termoblock a 55°C, hasta que el contenido quedó digerido.
5. Los microtubos se sacaron del termoblock y se agregó 300 µL de LiCl 5M y se agitó durante un minuto. Después se añadió 600 µL de cloroformo: alcohol-isoamílico (24:1) y se agitó brevemente.
6. La mezcla resultante se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min.
7. Se extrajeron 500 µL de la capa acuosa (parte superior) del tubo y se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 mL.
8. Se añadieron 50 µL de acetato de sodio 3 M, 1 mL de etanol absoluto frio; se procedió a agitar el tubo y se coloca a -20°C por 1 hora.
9. Se centrifugó durante 20 min a 13 000 rpm a 4°C y se retiró el sobrenadante.
10. Se agregaron 750 µL de etanol al 70% después se agitó por 15 min a temperatura ambiente, enseguida se centrifugó a máxima velocidad (14,000 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante.
11. El pellet de ADN se dejó secar en una campana de flujo laminar, una vez seco se añadió 50 µL de agua de 18Ω estéril para re-suspender el pellet (ADN).
12. Se calentaron los microtubos a 95°C por 5 minutos y se colocaron en hielo; al finalizar se guardaron las muestras a -20°C.

6.11.2 Concentración y Purificación del DNA

Para la determinación de la concentración y pureza del ADN se utilizó el espectrofotómetro DeNovix DS-11, en el que se colocó 1 µL de la muestra en el orificio lector y posteriormente la concentración (ng/mL) y relación 260/280 nm de absorbancia que representa la pureza y la concentración. La concentración del ADN se ajustó a 100 ng/mL para la amplificación del ADN.

6.11.3 Amplificación del Gen de la Región Variable V3 Gen 16S rRNA.

Para la preparación de la mezcla maestra se utilizó GoTaq® Flezi DNA Polimerasa de Promega. Cada reacción (muestra) fue de 23 µL más 2 µL de DNA (en tanta cada microtubo contenía 25 µL de reacción por tubo). Por cada mezcla se incluyó un control positivo (Mezcla de cepas) y negativo (Agua libre de nucleasas). La amplificación se verificó en gel de agarosa al 2% a 90 V durante 30 minutos.

Se amplificó por PCR una región de ≈200 pb correspondiente a la región variable V3 del gen 16S rRNA. Utilizando un primer (bar-code) en cada muestra, con la finalidad de organizar las secuencias obtenidas con la muestra correspondiente: (oligonucleótido delantero) 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG - CCTACGGGNGGCWGCAG -3', (oligonucleótido inverso) 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG - GACTACHVGGGTATCTAATCC -3'.

El protocolo de PCR utilizado para la amplificación es el siguiente: se estableció la etapa inicial (desnaturalización) en 95°C durante 5 min, seguido por 45 ciclos de amplificación donde se intercalaron 3 temperaturas (unión, alineación y extensión) en 3 periodos de tiempo (95°C/35s, 56°C/35s, y 72°C/1.3 min respectivamente), y 72 °C/10 min de extensión final. En las cuales se utilizó el instrumento BIO-RAD MyCycler™ Thermal Cycler, para las amplificaciones de PCR.

6.11.4 Purificación de los Producto de Amplificación V3 16s rRNA con Perlas Magnéticas

Las Ampure XP beads se usaron a temperatura ambiente y se les dio vórtex por 30 s para suspenderlas. Se agregaron 0.6 µL de perlas Ampure XP beads por cada µL de muestra tagmentada que se tenía, con la finalidad de obtener fragmentos >300 pb. Se mezcló lentamente por unas 10 veces aproximadamente e incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se colocaron en la gradilla magnética por 2 minutos, hasta que aclaro la solución, se retiró el sobrenadante de cada tubo con la micropipeta sin tocar las perlas magnéticas. Se hizo un lavado con 200 µL etanol frío al 80% (recién preparado) se incubó por 30 s o hasta que la solución se aclaró. El sobrenadante (etanol) se retiró con micropipeta. Los tubos se dejaron descubierto de 8 a 10 minutos para que se volatizara el etanol. Después se adicionaron 15 µL de Tris 10 Mm pH 8 o agua libre de nucleasas a cada tubo y se mezcló 10 veces aproximadamente para resuspender la muestra. Los tubos se

incubaron a temperatura ambiente por 2 minutos, se colocaron los tubos nuevamente en la gradilla magnética por 2 minutos o hasta que se aclaró la muestra. Posteriormente, se transfirieron 14 μ L del sobrenadante a un tubo de 0.2 mL y almaceno a 4 °C. El producto final del purificado se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

6.11.5 Secuenciación Masiva

Se preparó el templado en el equipo MiniSeq de Illumina, en el cual se ajustaron las muestras a una misma concentración equimolar, la cual inmoviliza los fragmentos a secuenciar sobre un sustrato específico que permite la amplificación y su enriquecimiento. Se realizó un lavado al secuenciador según las especificaciones del fabricante, se cargó el templado en el flow cell y se secuenció.

6.11.6 Análisis Bioinformático

Las secuencias generadas en formato FASTQ, fueron sometidas a una limpieza, ensamble, detección de quimeras y asignación taxonómica, este proceso se realizó con el pipeline metagenómico descrito en https://github.com/GenomicaMicrob/metagenomic_pipeline; el cual se describe a continuación.

6.11.6.1 Limpieza, ensamble y detección de quimeras. Las secuencias obtenidas se sometieron a una limpieza bioinformática, para eliminar las secuencias de baja calidad (QC<20), presencia de oligonucleótidos, adaptadores y “barcodes” y ensamblar las secuencias se usó el programa pair-end_cleaner (https://github.com/GenomicaMicrob/pair-end_cleaner). Se prosiguió con la detección y eliminación de quimeras utilizando el programa chimera_detector (https://github.com/GenomicaMicrob/chimera_detector), el cual implementa el programa Vsearch

V2.14.2 (Rognes *et al.*, 2016) con la base de datos de SILVA 128.

La asignación taxonómica y OTUs se realizó con el programa `mg_classifier` (https://github.com/GenomicaMicrob/mg_classifier) el cual realiza la asignación taxonómica para cada grupo taxonómico (Yarza *et al.*, 2004), con la base de datos EzBiocloud.

6.11.6.2 Análisis de OTUS. Los OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales) obtenidos con `mg_classifier` fueron evaluados con el lenguaje de programación R 3.6.3, en RStudio Version 3.6.3 (Mcmurdie *et al.*, 2013). El análisis para calcular la curva de rarefacción fue evaluada con la paquetería `ranacapa` (<https://github.com/gauravsk/ranacapa>). La abundancia relativa fue calculada con los 15 fila y familias más abundantes. Los valores de alfa diversidad fueron calculados con la paquetería `phyloseq` (<https://github.com/joey711/phyloseq>) (Mcmurdie *et al.*, 2013), con el índice de diversidad de Shannon, OTUs observados, `chao1` y `IvnSimpson`.

Las diferencias entre las comunidades (Beta diversidad) fueron determinadas con un análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS por sus siglas en inglés) con la distancia de Bray-Curtis (999 permutas), el análisis se implementó con la paquetería `Phyloseq`.

6.11.6.3 Análisis de predicción de vías metabólicas KEGG. El análisis para predecir respuestas funcionales de taxones bacterianos de las dietas evaluadas, se obtuvieron utilizando el programa `Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unbserved States (PICRUST`, V1.1.1, <http://picrust.github.io/picrust/>) (Langille *et al.*, 2013) y KEGG (Enciclopedia de genes de Kyoto y genomas, Kanehisha, Goto, Sato, Furumichi y Tanabe, 2012) los resultados obtenidos se analizaron utilizando `Stamp Versión 2.1.3` en el nivel 2 y 3.

6.12 Análisis Estadísticos

La evaluación de parámetros zootécnicos y somáticos se realizó un transformado arco-seno a los datos obtenidos, se evaluó la normalidad y homocedasticidad con el método de Levene y

Kolmogorov-smirnov respectivamente. Para identificar diferencias entre los grupos se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, posteriormente para denotar diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$), se prosiguió con la prueba post-hoc de Tukey.

En el análisis de puntuación semicuantitativa del estado de severidad de las patologías en la microanatomía intestinal, se evaluó la normalidad y homocedasticidad con el método de Levene y Kolmogorov-smirnov respectivamente, como las muestras no cumplieron con el supuesto de homogeneidad se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, ($P < 0.05$).

Las diferencias entre las comunidades de la microbiota intestinal (Beta diversidad) fueron determinadas con NMDS, con la distancia de Bray-Curtis (999 permutas), el análisis se implementó con la paquetería Vegan (Oksanen *et al.*, 2008). Para encontrar diferencias en la estructura de la comunidad entre las dietas, se implementó la prueba ADONIS por pares, distancia de Bray-Curtis y corrección de Bonferroni, utilizando Adonis V0.0.1 por pares (Martinez Arbizu, 2017; <https://github.com/pmartinezarbizu/pairwiseAdonis>).

El análisis realizado mediante PICRUST para la predicción funcional KEEG, fueron comparados mediante el método no paramétrico White's T-test ($P < 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de Composición Proximal Corporal

Los resultados de análisis corporal proximal inicial de la tilapia roja en base húmeda fueron de: 72.21% de humedad, 15.77% de proteína, 3.98% de ceniza y 0.38% de extracto libre de nitrógeno en promedio. En la Cuadro 2 se representan los valores promedio del análisis corporal proximal de los organismos al final del bioensayo.

Cuadro 2. Análisis de composición proximal corporal de tilapia roja *Oreochromis sp.* después de 75 días de experimentación (valores expresado en base húmeda).

Dieta	Proteína (%)	Lípidos (%)	Ceniza (%)	ELN (%)	Humedad (%)
HV	16.21±0.60 ^a	7.84±0.96 ^{ab}	4.00±0.21 ^a	0.16±0.09 ^a	71.79±1.45 ^a
HV 0.5%Q	15.26±0.42 ^b	7.93±0.85 ^{ab}	3.96±0.13 ^a	0.53±0.17 ^a	72.30±1.45 ^a
HV 1%Q	15.70±0.70 ^a	8.54±0.80 ^a	3.68±0.13 ^a	0.51±0.12 ^a	71.60±1.25 ^a
HV 2%Q	16.05±0.44 ^a	7.24±1.11 ^{ab}	4.00±0.12 ^a	0.23±0.15 ^a	72.48±1.39 ^a
LV	15.63±0.36 ^a	6.80±0.41 ^b	4.25±0.34 ^a	0.46±0.06 ^a	72.85±0.75 ^a

HV=dietas altas en vegetales (High vegetable), Q= Quitosano, LV= dieta baja en vegetal (Low vegetable). Los valores (la media±SD, n=3) con superíndice distinto muestra existencia de diferencias significativas entre peces alimentados con las diferentes dietas $p<0.05$ (Prueba de Tukey).

7.2 Evaluación de Parámetros Zootécnicos

En la Cuadro 3 se muestran los resultados de crecimiento, y rendimiento productivo de los peces alimentados con las cinco dietas durante 75 días de experimentación. Los organismos alimentados con las dietas altas en vegetales (HV, HV+0.5%Q, HV+1%Q y HV+2%Q) presentaron

significativamente ($P<0.05$) mejores resultados en parámetros zootécnicos en comparación con la dieta LV, puesto muestra el menor rendimiento productivo con un promedio con una PG = 11.16 ± 1.6 g, una TCA = 1.69 ± 0.2 y una TCE = 3.75 ± 0.18 %/día en comparación con las 4 dietas altas en vegetales (HV) con promedio de PG= 21.39 ± 2.9 g una TCA = 1.30 ± 0.1 y una TCE = 4.57 ± 0.16 %/día ($P>0.05$). No hay diferencias significativas ($P<0.05$) entre las dietas HV, HV+0.5%Q, HV+1%Q y HV+2%Q, los parámetros zootécnicos mostraron el mismo crecimiento, por lo tanto, el quitosano no tuvo un efecto en crecimiento al adicionarlo en las dietas altas en vegetales.

Cuadro 3. Parámetros de crecimiento y eficiencia del alimento en tilapia roja *Oreochromis sp.* durante 75 días de experimentación.

Dieta	PG (g)	TCA	PER (%)	TC (%)	TCE (%/día)	S (%)
HV	21.29 ± 3.4^a	1.30 ± 0.1^a	2.12 ± 0.2^a	2998.43 ± 472.5^a	4.57 ± 0.22^a	100 ± 0.0^a
HV 0.5%Q	21.36 ± 2.4^a	1.30 ± 0.1^a	2.08 ± 0.1^a	3007.98 ± 340.7^a	4.58 ± 0.15^a	96.7 ± 3.8^a
HV 1%Q	21.32 ± 2.9^a	1.27 ± 0.1^a	2.18 ± 0.3^a	3012.70 ± 394.1^a	4.58 ± 0.16^a	100 ± 0.0^a
HV 2%Q	21.60 ± 1.9^a	1.31 ± 0.1^a	2.09 ± 0.2^a	3042.44 ± 262.2^a	4.59 ± 0.11^a	96.7 ± 3.7^a
LV	11.16 ± 1.6^b	1.69 ± 0.2^b	1.61 ± 0.2^b	1571.83 ± 222.9^b	3.75 ± 0.18^b	100 ± 0.0^a

HV=dietas altas en vegetales (High vegetable), Q= Quitosano, LV= dieta baja en vegetal (Low vegetable). Los valores (media $\pm$ SD, n=60) con superíndice distinto muestra existencia de diferencias significativas entre peces alimentados con las diferentes dietas $p<0.05$ (Prueba de Tukey).

7.2.1 Peso Ganado (PG)

Las tilapias rojas alimentadas con las cuatro dietas con alto contenido vegetal y la dieta control sin y con adición de quitosano (HV, HV+0.5%Q, HV+1%Q, HV+2%Q) mostraron una mayor ganancia de peso, en comparación con la dieta baja en vegetales LV ($P<0.05$).

7.2.2 Tasa de Crecimiento (TC)

Como se observa en la Cuadro 3 la inclusión de quitosano no influyó en el crecimiento de la tilapia roja al ser alimentadas con dietas altas en vegetales ($P<0.05$). Sin embargo, se presentó mayor crecimiento con estas dietas HV en comparación LV ($P<0.05$).

7.2.3 Tasa Específica de Crecimiento (TCE)

Las dietas altas en vegetales con y sin quitosano HV no mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) y se obtuvo un resultado de TCE de 4.58%/día, mientras que la dieta baja en vegetales LV presento una TCE significativamente menor de 3.75%/día ($P<0.05$).

7.2.4 Supervivencia (S)

Se obtuvo un resultado para supervivencia entre el 96 al 100%, sin encontrar diferencias significativas entre las dietas ($P<0.05$) (Cuadro 3).

7.2.5 Tasa de Conversión Alimenticia (TCA)

Las dietas altas en vegetales con quitosano (HV+0.5%Q, HV+1%Q, HV+2%Q) no mostraron diferencias significativas con la dieta control (HV), por lo que se mantuvieron en una TCA de 1.3 ± 0.1 , mientras que la dieta baja en vegetales sin quitosano (LV) si muestra una diferencia en comparación con las demás dietas ya que presento una TCA de 1.69 ± 0.2 .

7.3 Evaluación de Índices Corporales Somáticos

En la Cuadro 4 se muestran los valores de los índices corporales somáticos, factor de condición, índice hepatosomático y la relación de grasa intraperitoneal, los cuales no muestran diferencia significativa entre los organismos ($P>0.05$).

Cuadro 4. Evaluación de índices corporales somáticos de tilapia roja *Oreochromis sp.* después de 75 días de experimentación.

Dieta	factor de condición	Índice viscerosomático	Índice hepatosomático	Relación grasa intraperitoneal.
HV	1.671±0.21	6.107±1.1	2.501±0.68	0.910±0.81
HV 0.5%Q	1.660±0.37	5.383±1.21	2.691±1.11	1.264±0.88
HV 1%Q	1.520±0.11	5.604±1.21	2.671±0.68	1.169±0.64
HV 2%Q	1.507±0.20	5.440±0.72	2.740±0.91	0.532±0.68
LV	1.498±0.20	6.385±1.43	2.735±1.13	1.751±0.89

HV=dietas altas en vegetales (High vegetable), Q= Quitosano, LV= dieta baja en vegetal (Low vegetable). Los valores (media±SD, n=16) no presentan diferencias significativas entre peces alimentados con las diferentes dietas $p<0.05$.

7.4 Evaluación Semicuantitativa de la Microanatomía del Tejido Intestinal de Tilapia roja *Oreochromis sp.*

Se siguió el sistema de puntuación semicuantitativa de Urán et al. 2008, (Cuadro 11, Anexo 1) para los resultados obtenidos de la evaluación semicuantitativa, de pliegues de la mucosa (PM), Células Goblet (CG), Gránulos Eosinófilos (EG), Lámina Propia (LP) y Mucosa Sub-epitelial (MS) y para la puntuación semicuantitativa de los grados de inflamación linfocítica (LF, Linfocitos) se utilizó el sistema de puntuación semicuantitativa en tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con dietas altas en vegetales observadas en este estudio (Cuadro 12 y Figuras 22-26, en el Anexo 2).

Los elementos microanatómicos intestinales analizados en la sección proximal que presentaron diferencias significativas, fue la presencia de linfocitos (LF) y células goblet (CG), en donde se

muestra un mayor grado de severidad en los organismos alimentados con HV y LV, comparados con los organismos alimentados con HV+1%Q y HV+2%Q que presentaron menor grado de severidad en estos elementos. En los demás elementos microanatómicos se presentan con un grado de severidad normal (1) a aguda (2 a 3), en los cuales no se presentan diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 5) ($P>0.05$).

Cuadro 5. Evaluación del grado de enteritis en la sección intestinal proximal de tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con dietas altas en vegetales.

Elementos microanatómicos intestinales.						
DIETAS	PM	CG	EG	LP	MS	LF
HV	3.13±0.99 ^a	3.00±0.76 ^a	1.88±0.99 ^a	3.00±1.07 ^a	2.25±0.46 ^{ab}	3.00±1.12 ^a
HV+0.5%Q	2.50±0.93 ^a	2.50±0.93 ^{ab}	2.00±1.51 ^a	2.63±1.19 ^a	2.25±1.16 ^{ab}	2.75±0.66 ^{ab}
HV+1%Q	2.25±1.16 ^a	1.75±1.04 ^{ab}	1.00±0.01 ^a	2.25±1.04 ^a	1.75±0.89 ^b	2.25±1.09 ^b
HV+2%Q	2.62±1.06 ^a	1.63±0.92 ^b	1.13±0.35 ^a	2.25±1.04 ^a	2.00±0.93 ^{ab}	2.00±1.07 ^b
LV	3.25±0.89 ^a	3.25±0.71 ^a	1.00±0.01 ^a	3.50±0.76 ^a	3.13±0.35 ^a	2.75±1.09 ^{ab}

PM, pliegues de la mucosa; GC, Células Goblet; EG, Gránulos Eosinófilos; LP, Lamina Propia; SM, Mucosa Sub-epitelial; LF, Linfocitos. Los valores (media±SD, n=8) con superíndices diferentes denotan diferencias significativas ($P<0.05$), Comparación múltiple de Kruskal-Wallis.

En la sección distal se presentó un diagnóstico más homogéneo en cuanto a los grados de severidad intestinal, en donde solo se encontraron diferencias en los elementos GC con diferencias significativas entre LV y HV+2%Q, en los demás elementos microanatómicos se presentan con un grado de severidad normal (1) a aguda (2 a 3), los cuales no presentan diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Evaluación de grado de enteritis en la sección intestinal distal de tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con dietas altas en vegetales.

Elementos microanatómicos intestinales.							
DIETAS	PM	SVM	CG	EG	LP	MS	LF
HV	2.75±0.89 ^a	2.25±0.71 ^a	2.63±0.74 ^{ab}	1.63±1.06 ^a	3.50±0.93 ^a	2.38±0.52 ^a	2.63±0.86 ^a

HV+0.5%Q	2.50±0.93 ^a	2.13±1.13 ^a	2.25±1.16 ^{ab}	1.88±1.46 ^a	2.50±1.31 ^a	2.00±0.76 ^a	2.75±0.66 ^a
HV+1%Q	1.88±0.83 ^a	1.38±0.74 ^a	1.38±0.52 ^b	1.00±0.01 ^a	2.13±0.99 ^a	2.00±0.76 ^a	2.13±0.60 ^a
HV+2%Q	1.88±0.83 ^a	1.25±0.46 ^a	1.25±0.46 ^{ab}	1.00±0.01 ^a	2.00±0.76 ^a	2.13±0.64 ^a	2.00±0.71 ^a
LV	2.38±0.92 ^a	2.38±1.06 ^a	3.00±0.53 ^a	1.00±0.01 ^a	2.63±0.52 ^a	2.25±0.89 ^a	2.25±0.66 ^a

PM, pliegues de la mucosa; SVM, Vacuolas Supranucleares; GC, Células Goblet; EG, Gránulos Eosinófilos; LP, Lámina Propia; SM, Mucosa Sub-epitelial; LF, Linfocitos. Los valores (media±SD, n=8) con superíndices diferentes por columna denotan diferencias significativas (P<0.05) por columna, Comparación múltiple de Kruskal-Wallis.

7.5 Evaluación en Microscopio Óptico de la Microanatomía del Tejido Intestinal.

La Figura 5 muestra la microanatomía intestinal de los organismos alimentados con la dieta HV, en un corte longitudinal de las vellosidades intestinales, las cuales presentaron arreglos anormales de los elementos microanatómicos, se observa ensanchamiento de lámina propia (LP) y sub-mucosa (SM) epitelial en el corte se la sección proximal (A) y distal (B). En la sección proximal (C) a mayor aumento, se observa una mayor presencia de linfocitos en lámina propia y sub-mucosa así como algunos signos de congestión sanguínea, en la sección distal (D) la deformación de las vellosidades, debido al engrosamiento de lámina propia por inflamación linfocítica y distribución difusa de vacuolas supranucleares de pequeño tamaño cerca de la membrana apical en la mayoría de los enterocitos (D).

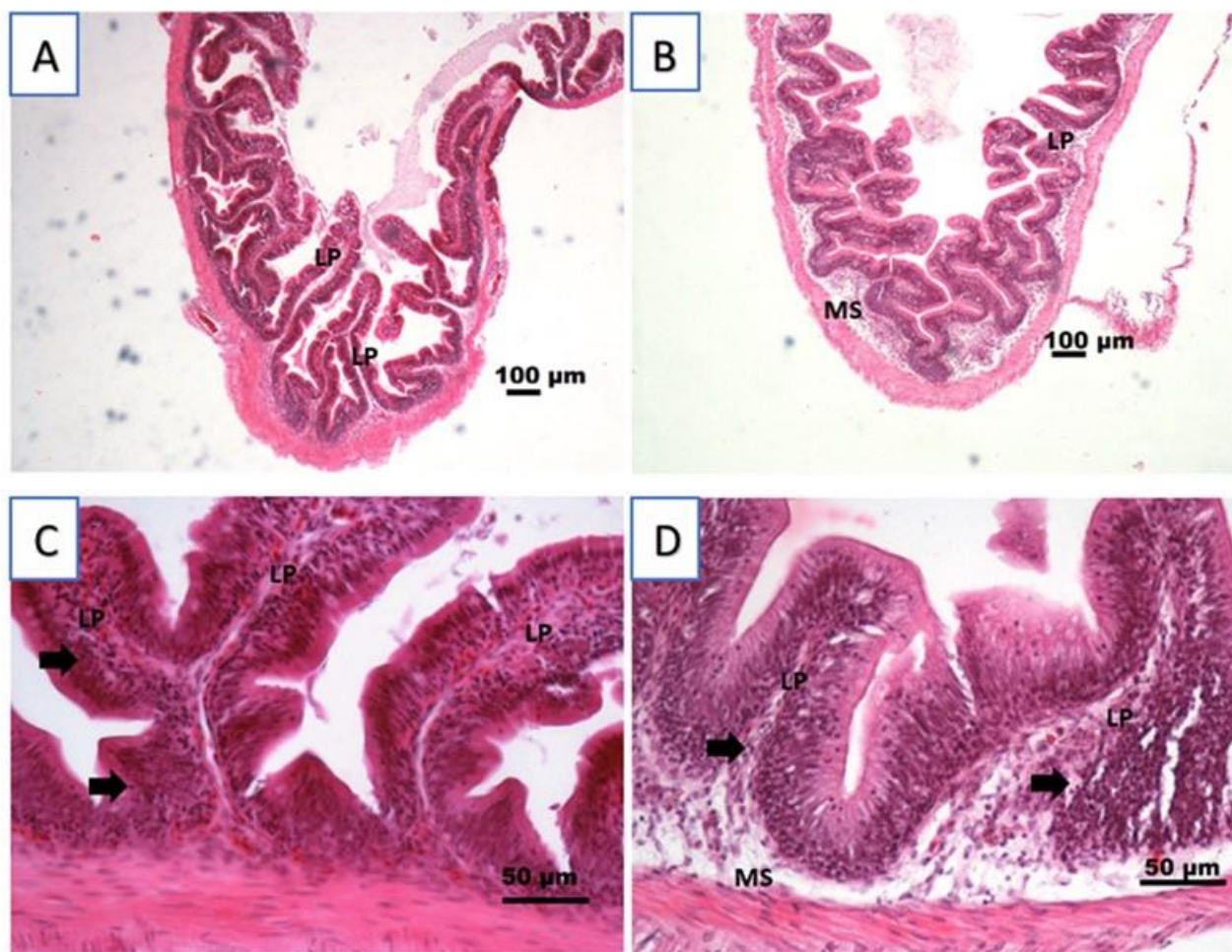


Figura 5. Corte longitudinal del intestino de tilapia roja *Oreochromis sp.* Alimentada con dieta control alta en vegetal sin quitosano (HV, control). A: Sección proximal, B: Sección distal, C: Sección proximal, D: Sección distal. Se observó LP aumentada, pliegues con longitud normal (A, C). LP ensanchada, una mayor infiltración de linfocitos (flechas) en el área de enterocitos, LP y MS en las figuras B y D. H&E.

La Figura 6 muestra la microanatomía intestinal de los organismos alimentados con la dieta LV, en un corte sagital de las vellosidades intestinales, en la observación a 4x se ve un arreglo aparentemente normal de los elementos microanatómicos, se observa buena longitud en las vellosidades, buen tamaño de LP y SM epitelial en el corte de la sección proximal (A) y distal (B), al aumentar el objetivo del microscopio a 20x se observó la presencia de necrosis en la zona de lámina propia, un ligero ensanchamiento de esta zona y presencia de linfocitos en la sección proximal (C), en la sección distal se muestra ligera deformación de las vellosidades, debido al engrosamiento de LP por inflamación (D).

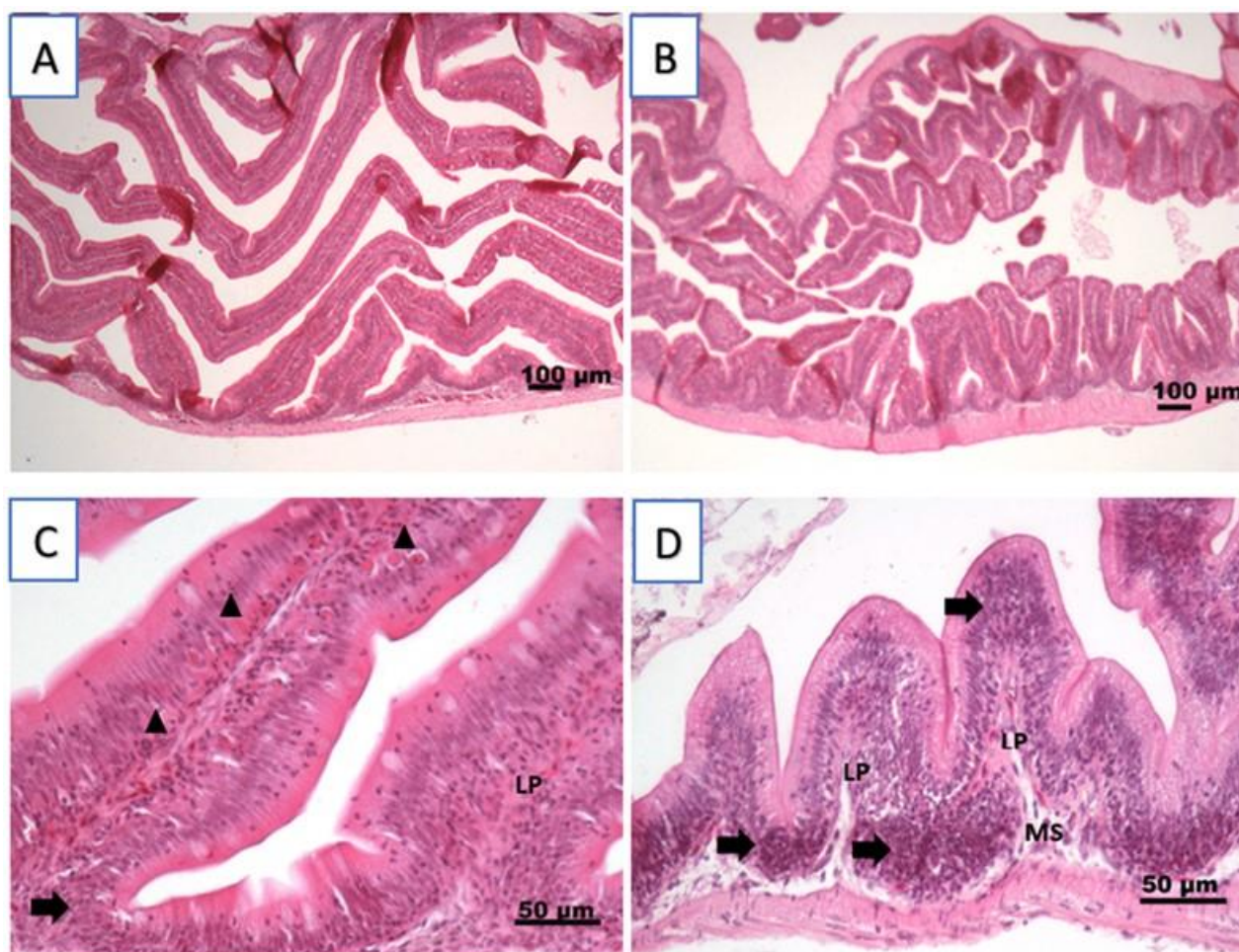


Figura 6 Corte longitudinal del intestino de tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con dieta baja en vegetal sin quitosano (LV). A: Sección proximal, B: Sección distal, C: Sección proximal, D: Sección distal. Se observaron pliegues con longitud normal, SM y LP aparentemente normales (A y B); en C y D se observa necrosis y carreoresis (triángulo) y mayor infiltración de linfocitos (flechas). H&E.

La Figura 7 muestra la microanatomía intestinal de los organismos alimentados con la dieta HV+0.5%Q, en un corte longitudinal de las vellosidades intestinales, las cuales presentaron arreglos anormales de los elementos microanatómicos, se observa ensanchamiento de LP y SM epitelial en el corte se la sección proximal (A) y distal (B), en una observación a 20x se una mayor presencia de linfocitos, seguido de una severa inflamación por gránulos eosinófilos (EG) en LP y SM, así como un mayor conteo de células de moco (CG) en la sección proximal (C), en la sección distal (D) se observa la deformación de las vellosidades, debido al engrosamiento de LP por inflamación linfocítica.

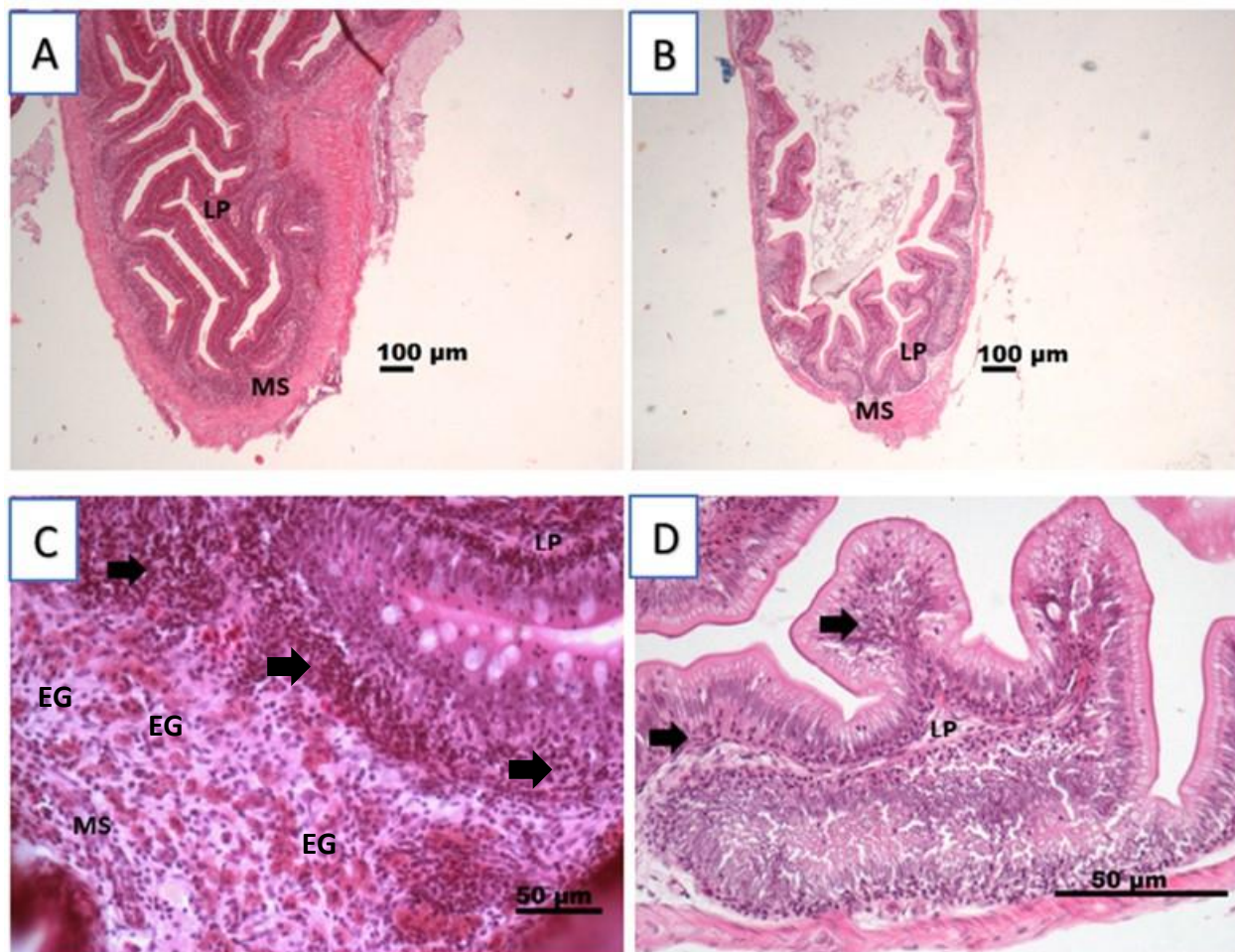


Figura 7. Corte longitudinal del intestino de tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con dieta alta en vegetal con 0.5% de quitosano (HV+0.5%QU). A: Sección proximal, B: Sección distal, C: Sección proximal, D: Sección distal. En C y D se observa número difuso de EG y mayor número de linfocitos (flecha) en LP y MS, también engrosamiento y deformidad de la LP. H&E.

La Figura 8 muestra la microanatomía intestinal de los organismos alimentados con HV+1%Q, en un corte sagital de las vellosidades intestinales, las cuales presentaron arreglos normales de los elementos microanatómicos, como los enterocitos (células de absorción de nutrientes), así como tamaño normal de LP y SM, con presencia típica o normal de linfocitos (células del sistema inmune) tanto en la sección proximal (A y C) como en la sección distal (B), en la sección distal (D) se observa un ligero ensanchamiento de LP y un ligero aumento de linfocitos en esta zona.

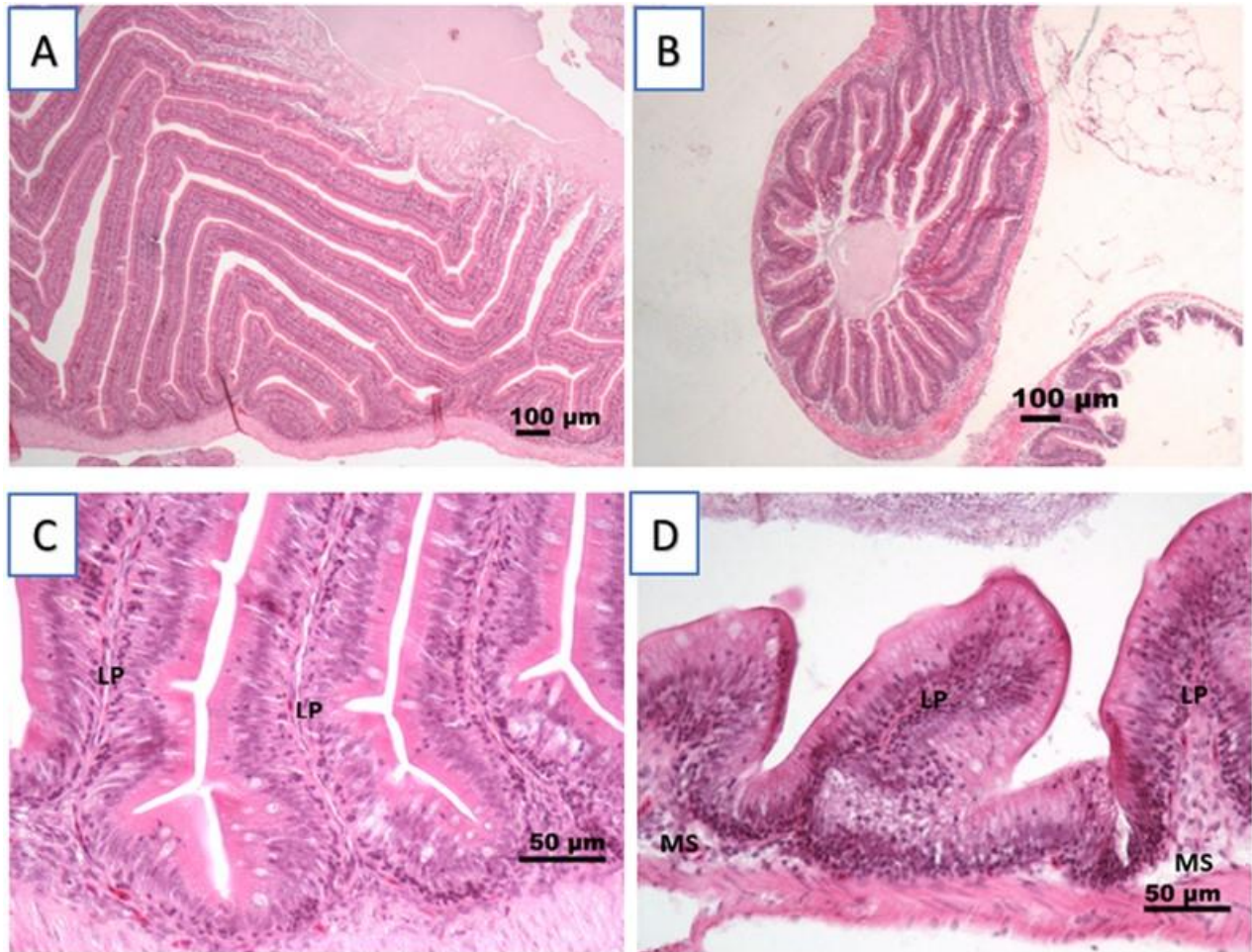


Figura 8. Corte longitudinal del intestino de tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada dieta alta en vegetal con 1% de quitosano (HV + 1%). A: Sección proximal, B: Sección distal, C: Sección proximal, D: Sección distal. Mucosa y submucosa normal, pliegues delgados con longitud basal y lamina propia delgada, en D se observa un ligero ensanchamiento de submucosa. H&E.

Las observaciones realizadas en la Figura 9 muestran a los organismos alimentados con la dieta HV+2%Q, los cuales presentaron una microanatomía similar con Figura 8 que muestra la microanatomía intestinal de los organismos alimentados con HV+2%Q, las cuales presentaron arreglos normales de los elementos microanatómicos, como los enterocitos, tamaño normal de LP y SM epitelial, con presencia típica o normal de linfocitos en la sección proximal (A y C) y en la sección distal (B y D).

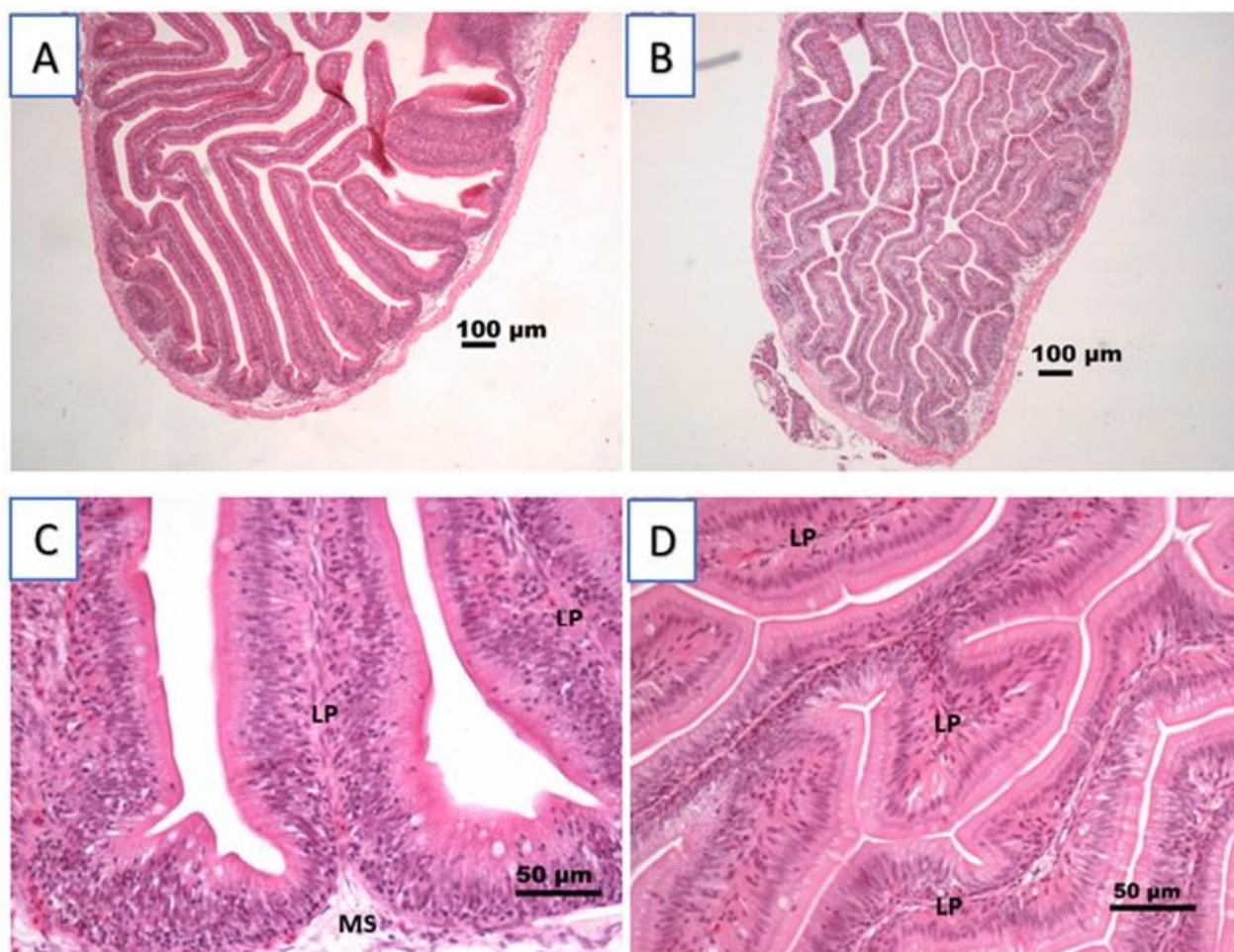


Figura 9. Corte longitudinal del intestino de tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con dieta alta en vegetal con 2% de quitosano (HV + 2%). A: Sección proximal, B: Sección distal, C: Sección proximal, D: Sección distal. Mucosa y submucosa normal, pliegues delgados con longitud basal y LP delgada, ligero ensanchamiento de submucosa (C). H&E.

Los resultados mostrados semi-cuantitativamente y cualitativamente, demuestran que las dietas que presentaron mejores resultados a nivel microanatómico intestinal fueron las dietas HV+1%Q y HV+2%Q, las cuales presentaron un menor grado de severidad en los cambios del tejido intestinal, y presentaron menor cantidad de organismos con presencia de patologías gastrointestinales (inflamación linfocítica, inflamación eosinofílica, necrosis y congestión) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resumen de signos presentados en la microanatomía intestinal de tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada con dietas a base de ingredientes vegetales adicionadas con quitosano.

Dietas	Diagnóstico
HV	5/8 organismos presentaron patologías severas de inflamación linfocíticas (grado 3 a 5) y ensanchamiento de lámina propia (grado 3 a 5), congestión y 3 casos de inflamación eosinófila (grado 3 a 4).
HV + 0.5%Q	5/8 organismos presentaron patologías severas de inflamación linfocítica (grado 3 a 5), ensanchamiento de lámina propia (grado 3 a 5) congestión y 2 casos de inflamación eosinófila (grado 3 a 5).
HV + 1% Q	3/8 organismos presentaron patologías severas de inflamación linfocítica (grado 3 a 4).
HV + 2%Q	3/8 organismos presentaron patologías severas de inflamación linfocítica (grado 3 a 4).
LV	5/8 organismos presentaron patologías severas de inflamación linfocítica (grado 3 a 5), ensanchamiento de lámina propia (grado 3 a 5) y 2 casos de necrosis intestinal.

7.6 Microbiota Intestinal de Tilapia roja *Oreochromis sp.*

7.6.1 Secuenciación

Las muestras seleccionadas para la secuenciación (Cuadro 8), fue el contenido intestinal de la sección distal del intestino de la tilapia, se secuenciaron 36 muestras (12 por tratamiento) de la dieta alta en vegetales sin quitosano (HV, control), la dieta alta en vegetales con 2% de quitosano (HV+2%Q) y la dieta baja en vegetales (LV).

Cuadro 8. Muestras de intestino de tilapia roja *Oreochromis sp.* que fueron secuenciadas.

HV	HV+2%Q	LV
T6-1	T5-1	T4-1
T6-2	T5-2	T4-2
T6-3	T5-3	T4-3
T6-4	T5-4	T4-4
T10-1	T11-1	T12-1

T10-2	T11-2	T12-2
T10-3	T11-3	T12-3
T10-4	T11-4	T12-4
T16-1	T14-1	T18-1
T16-2	T14-2	T18-2
T16-3	T14-3	T18-3
T16-4	T14-4	T18-4

HV: Dieta control alto en vegetal sin quitosano (High Vegetable); HV+2%Q: Dieta alta en vegetal con 2% de quitosano (Chitosan Diet); LV: Dieta control bajo en vegetal (Low Vegetable). T: Tanque, número de tanque, número de muestra.

7.6.2 Limpieza, Ensamble y Detección de Quimeras.

Se eliminó el 11.505% de las secuencias totales obtenidas, con un promedio de 1,452,240 (~179 pb) de secuencias útiles ensambladas (Cuadro 9). Se realizó una detección de 1,119,046 (~180 pb) secuencias quiméricas, las cuales fueron eliminadas, utilizando la base de datos de SILVA_128, generando secuencias libres de quimeras, prosiguiendo con el análisis bioinformático (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resumen del proceso de limpieza, ensamble y quimeras de las secuencias.

Dieta	Muestra	Secuencias totales	Secuencias ensambladas	Secuencias libres de quimeras	Calidad (Qc<20)	Secuencias eliminadas (%)
HV	T10	54272	49882	40808	4390	8.08
	T11	42138	37819	38483	4319	10.25
	T12	42382	33153	40887	9229	21.77
HV+2%Q	T14	46865	42902	25307	3963	8.45
	T16	51494	47376	31182	4117	7.99
	T18	38256	29405	34685	8850	23.13
LV	T4	46047	40862	26237	5185	11.26
	T5	34279	31343	27491	2936	8.56
	T6	54575	50315	22393	4260	7.80

HV: Dieta control alto en vegetal sin quitosano (High Vegetable); HV+2%Q: Dieta alta en vegetal con 2% de quitosano (Chitosan Diet); LV: Dieta control bajo en vegetal (Low Vegetable). T: Tanque.

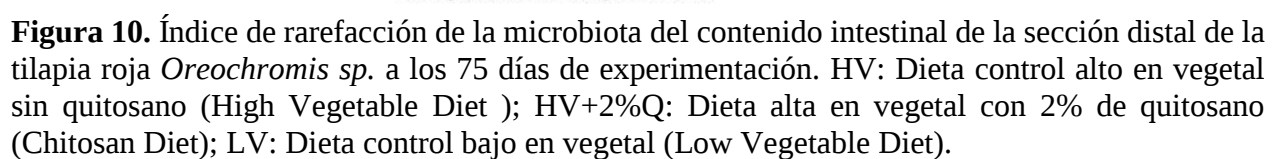
7.6.3 Asignación Taxonómica (OTUs)

Se realizó una clasificación de secuencias con la base de datos EzBioCloud, de los cuales fueron asignados 1,106,344 secuencias (98.86%). El 100% de los OTUs detectados fueron correspondientes al dominio Bacteria; se detectaron en total 19 Fila, 34 Clases, 70 Orden, 135 Familias y 292 Géneros.

7.6.4 Rarefacción

Un análisis que se puede hacer con la riqueza, es una curva de rarefacción, para saber si se obtuvieron suficientes asignaciones taxonómicas (OTUs) con las secuencias obtenidas.

Entre más profundo sea el muestreo, mayor será el número de especies colectadas, lo cual será reflejado en una mayor pendiente en la curva, una pendiente positiva indica que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para obtener muestras representativas de la totalidad de las secuencias, las pendientes negativas o cero indican lo contrario (Sackmann, 2006; Navarro, 2015).



7.6.5 Abundancia Relativa de la Comunidad Bacteriana Intestinal de la Tilapia roja *Oreochromis sp.*

La familia Fusobacteriaceae predominó en las dietas altas en vegetales independientemente de la adición del prebiótico (quitosano), ya que tanto en la dieta control sin quitosano (HV) y con quitosano (HV+2%Q) muestran que Fusobacteriaceae (84.27%) es la familia más abundante en la tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada bajo este régimen alimenticio. Los organismos alimentados con dietas bajas en vegetales (LV), presentaron un mayor número de familias, las más abundantes fueron Vibrionaceae (50.45%), seguido de otras familias como: Fusobacteriaceae (15.81%), Rhodobacteraceae (8.05%), Comamonadaceae (4.81%) y Aeromonadaceae (3.46%) son las familias más abundantes (Figura 11).

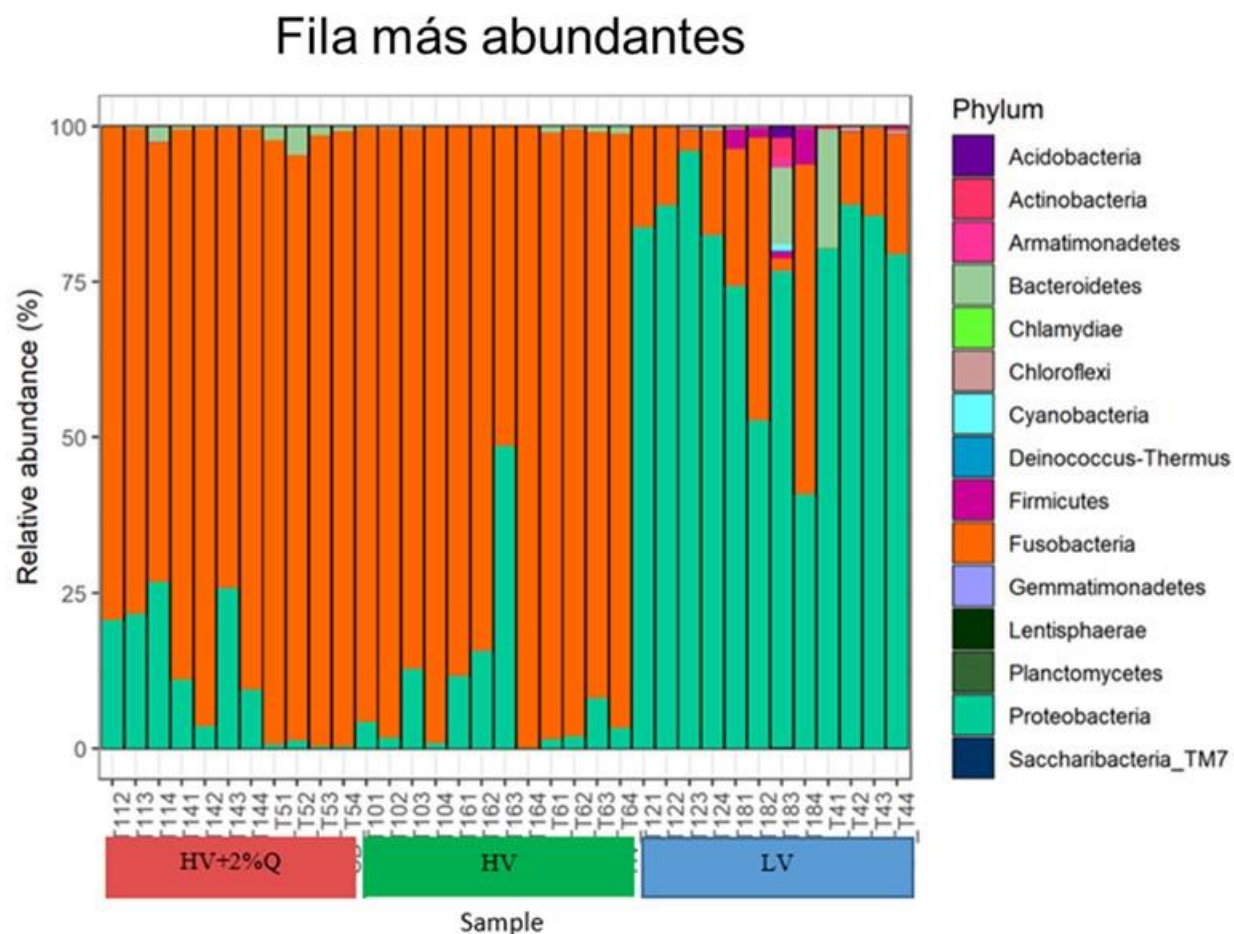


Figura 11. Abundancia relativa de los 15 principales filas presentes en las muestras de contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* después de 75 días de experimentación.

La familia Fusobacteriaceae predominó en las dietas altas en vegetales independientemente de la adición del prebiótico (quitosano), ya que tanto en la dieta control sin quitosano (HV) y con quitosano (HV+2%Q) muestran que Fusobacteriaceae (84.27%) es la familia más abundante en la tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentada bajo este régimen alimenticio, mientras que en los organismos alimentados con dietas bajas en vegetales (LV), tienen una mayor distribución en la abundancia de familias, en donde la predominante fue Vibrionaceae (50.45%), seguido de otras familias como: Fusobacteriaceae (15.81%), Rhodobacteraceae (8.05%), Comamonadaceae (4.81%) y Aeromonadaceae (3.46%) son las familias más abundantes (Figura 12).

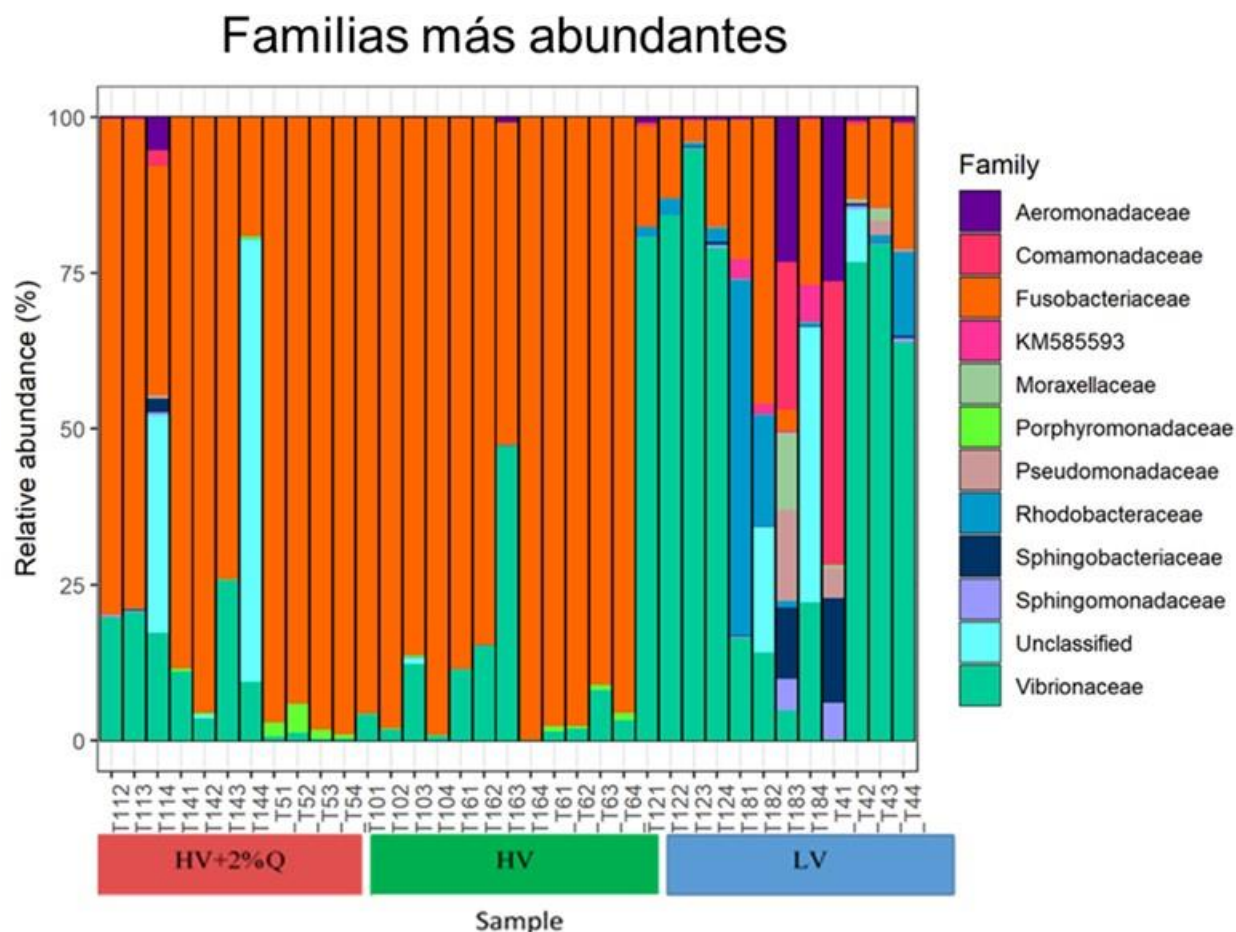


Figura 12. Abundancia relativa de las 15 principales familias presentes en muestras de del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja *Oreochromis* sp. después de 75 días de experimentación.

Las estimaciones de abundancia se obtuvieron en el conteo de taxones clasificados por filo y familia, se reportaron los 15 principales taxones obtenidos en los siguientes dominios. Independiente de la dieta y del quitosano, la fila más abundante en las dietas fueron Proteobacterias y Fusobacterias, sin embargo en diferente proporción. El mapa de agrupamiento jerárquico de los perfiles de composición de la microbiota intestinal representados por amplicones de ARN ribosómico 16S por muestra (Figura 13). El color de los gradientes va de azul (más abundante) a blanco (sin abundancia) muestra la abundancia relativa a escala de familia de cada taxón de todas las muestras. Los perfiles de la comunidad presentados son el resultado de tres réplicas técnicas para cada fracción de muestreo. Las bacterias que se muestran representan los 15 taxones con la mayor abundancia relativa media en todas las muestras.

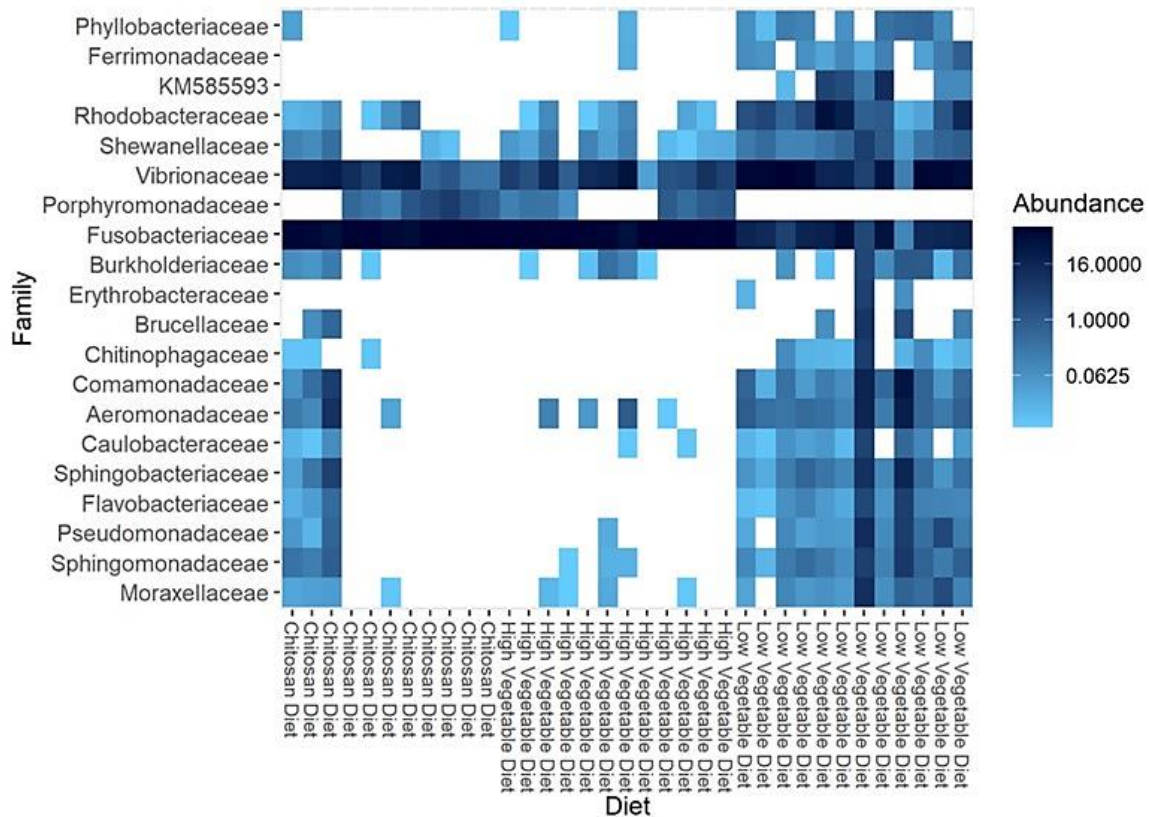


Figura 13. Heat-map de la abundancia a nivel familia de la microbiota del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* por tanque a los 75 días de experimentación. HV: Dieta control alto en vegetal sin quitosano (High Vegetable Diet); HV+2%Q: Dieta alta en vegetal con 2% de quitosano (Chitosan Diet); LV: Dieta control bajo en vegetal (Low Vegetable Diet).

7.6.6 Medidas de Diversidad Alfa de la Microbiota Intestinal de Tilapia roja *Oreochromis sp.*

En cada métrica de diversidad alfa de Shannon, OTUs observados, Chao1 y InvSimpson de la microbiota del contenido intestinal de tilapia roja *Oreochromis sp.*, muestra significativamente ($P < 0.05$) una mayor diversidad en microbiota intestinal en los organismos alimentados con la dieta LV que los organismos alimentados con HV y HV+2%Q., lo cual muestra que los organismos alimentados con dietas altas en vegetales, reduce la diversidad microbiana intestinal, independientemente de agregar quitosano a la formulación, lo cual indica que la disbiosis generada en los organismos fue causada directamente por los ingredientes vegetales (Figura 14).

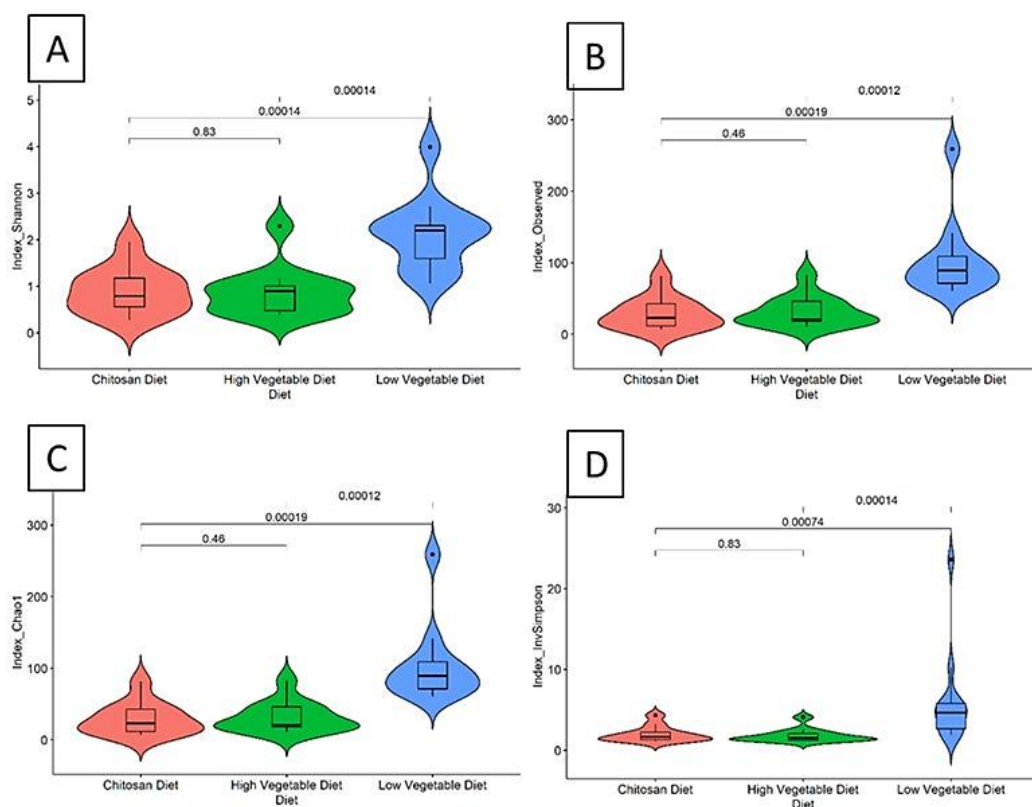


Figura 14. Índices de diversidad alfa: Índice de Shannon (A), OTUs observados (B), chao1 (C) y InSimpson (D) de la microbiota del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* Datos agrupados por dietas a los 75 días de experimentación. HV: Dieta control alto en vegetal sin quitosano (High Vegetable Diet); HV+2%Q: Dieta alta en vegetal con 2% de quitosano (Chitosan Diet); LV: Dieta control bajo en vegetal (Low Vegetable Diet). Los valores $p < 0.05$ denotan diferencias significativas, Wilcoxon test

7.6.7 Diversidad Beta de la Microbiota Intestinal de Tilapia roja *Oreochromis sp.*

Los resultados de diversidad beta en los grupos evaluados (Figura 15 y 16) muestran que hay diferencia significativa (Cuadro 10) en la estructura de la comunidad microbiana de los organismos alimentados con LV comparado con los grupos HV y HV+2 ($P < 0.05$), en donde los clusters del grupo LV no comparten características semejantes entre sí con HV y HV+2%Q.

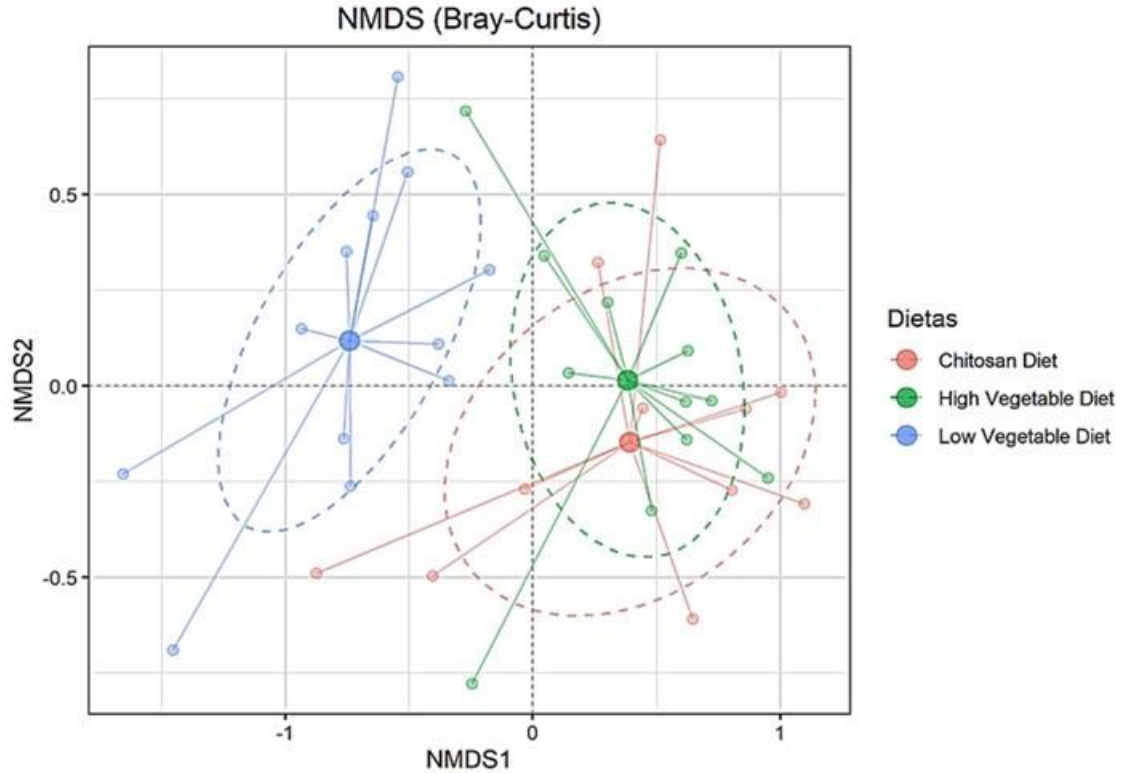


Figura 15. Diversidad beta Bray-Curtis método NMDS con los datos agrupados (elipses) de la microbiota del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* de datos agrupados por dietas a los 75 días de experimentación. HV: Dieta control alto en vegetal sin quitosano (High Vegetable Diet); HV+2%Q: Dieta alta en vegetal con 2% de quitosano (Chitosan Diet); LV: Dieta control bajo en vegetal (Low Vegetable Diet).

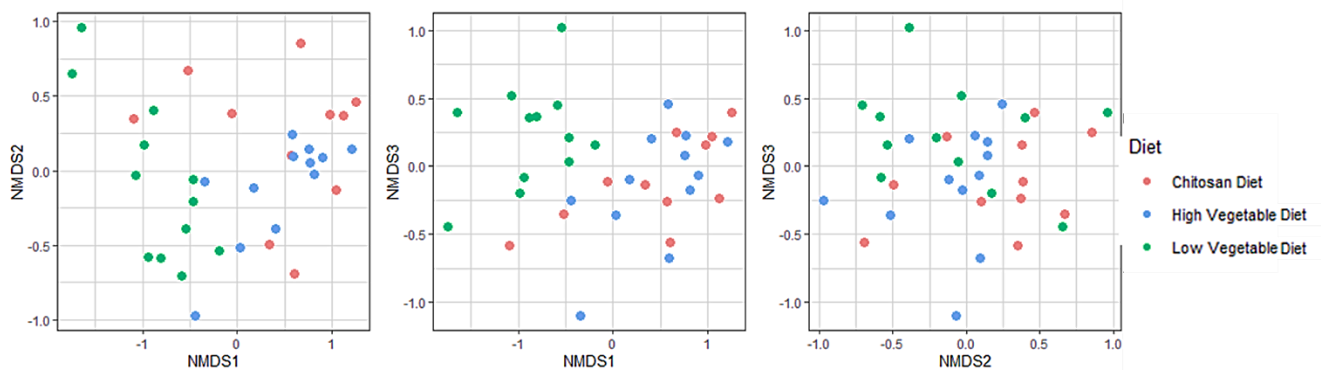


Figura 16. Diversidad beta Bray-Curtis método PCoA de la microbiota del contenido intestinal de la sección distal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* de datos agrupados por dietas a los 75 días de experimentación. HV: Dieta control alto en vegetal sin quitosano (High Vegetable Diet); HV+2%Q: Dieta alta en vegetal con 2% de quitosano (Chitosan Diet); LV: Dieta control bajo en vegetal (Low Vegetable Diet).

Cuadro 10 Diferencias en la microbiota intestinal de tilapia roja *Oreochromis sp.* implementando ADONIS por pares, distancia de Bray-Curtis y corrección de Bonferroni.

ADONIS, distancia Bray-Curtis, corrección Bonferroni				
Dietas	Modelo F.	R2	P<0.05	P. ajustado
HV+2%Q vs HV	0.27	0.989	0.045	0.352
HV+2%Q vs LV	1.25	3.988	0.159	0.002*
HV vs LV	1.44	4.528	0.170	0.002*

7.6.8 Predicciones de la Composición Funcional en las Vías KEGG de la Microbiota Intestinal de la Tilapia roja *Oreochromis sp.*

Los organismos alimentados con dietas altas en vegetales con y sin quitosano (HV, High Vegetable Diet y HV+2%Q, Chitosan Diet), muestran que los perfiles funcionales de las vías metabólicas KEGG a nivel 2 son similares, sin embargo estos grupos comparados con LV (baja en vegetales) muestran diferencias significativas ($P<0.05$) en la mayoría de sus perfiles metabólicos. Las comunidades bacterianas de las dietas altas en vegetales, muestran una mayor actividad en el perfil funcional del metabolismo de los carbohidratos y energía, mientras que los organismos alimentados con dietas bajas en vegetales, mostraron que el perfil funcional de la microbiota intestinal favorece el metabolismo de los aminoácidos, motilidad celular y metabolismo lipídico (Figura 17).

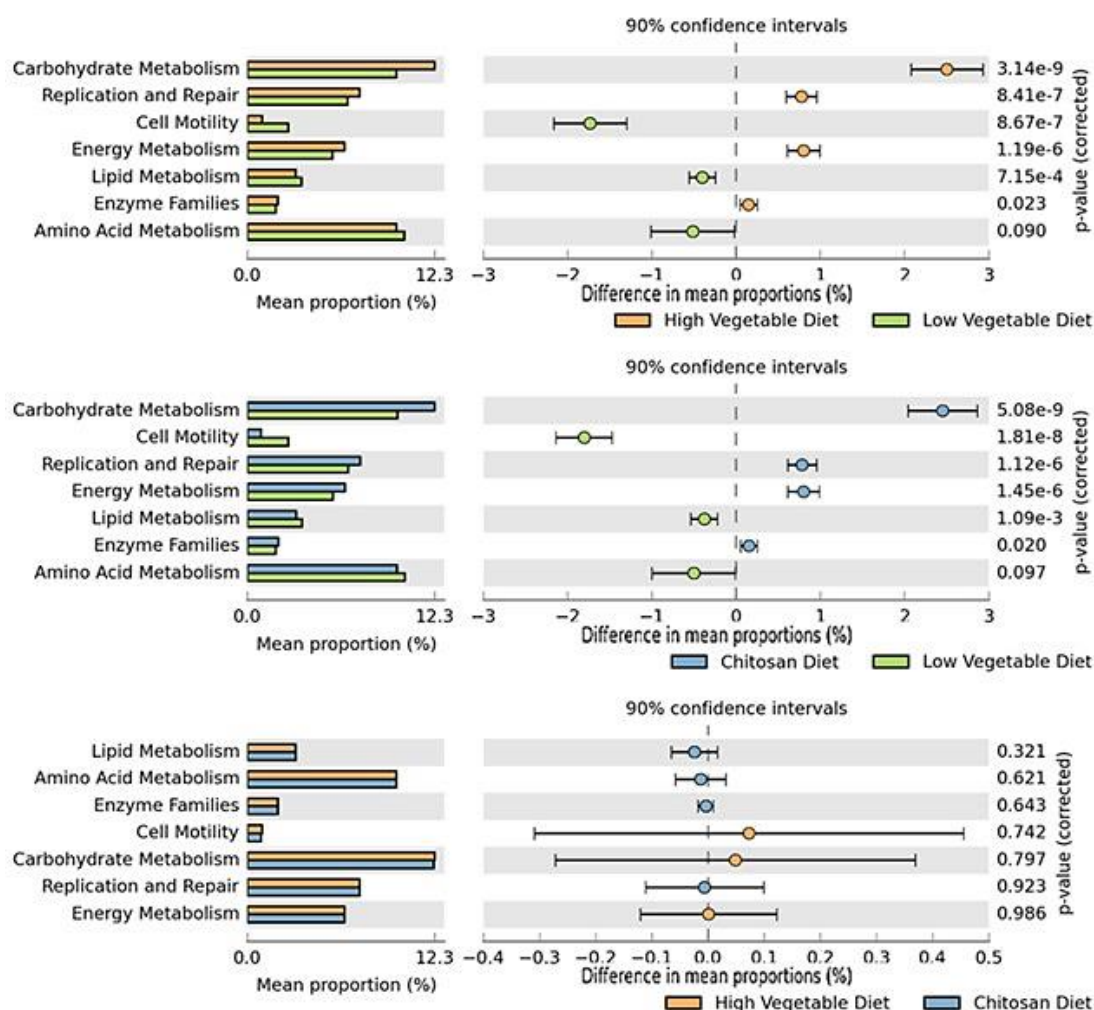


Figura 17. Predicciones PICRUST de la composición funcional en las vías KEGG de nivel 2 de la microbiota intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* Los puntos del lado derecho ilustran las diferencias en las proporciones medias (%) entre dos grupos indicados usando valores p.

Las predicciones generadas por PICRUST de la composición funcional en las vías KEGG de nivel 3 de la microbiota intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentadas con HV y LV, muestran diferencias significativas en la mayoría de las rutas metabólicas, destacando el metabolismo de aminoácidos, metabolismo de fructuosa y manosa, glucolisis, glucogenólisis, metabolismo de amino-azúcares y metabolismo energético (Figura 18)., estas rutas que pertenecen al metabolismo energético a partir de carbohidratos, el cual coincide a las rutas mencionada en el nivel 2 (Figura 17).

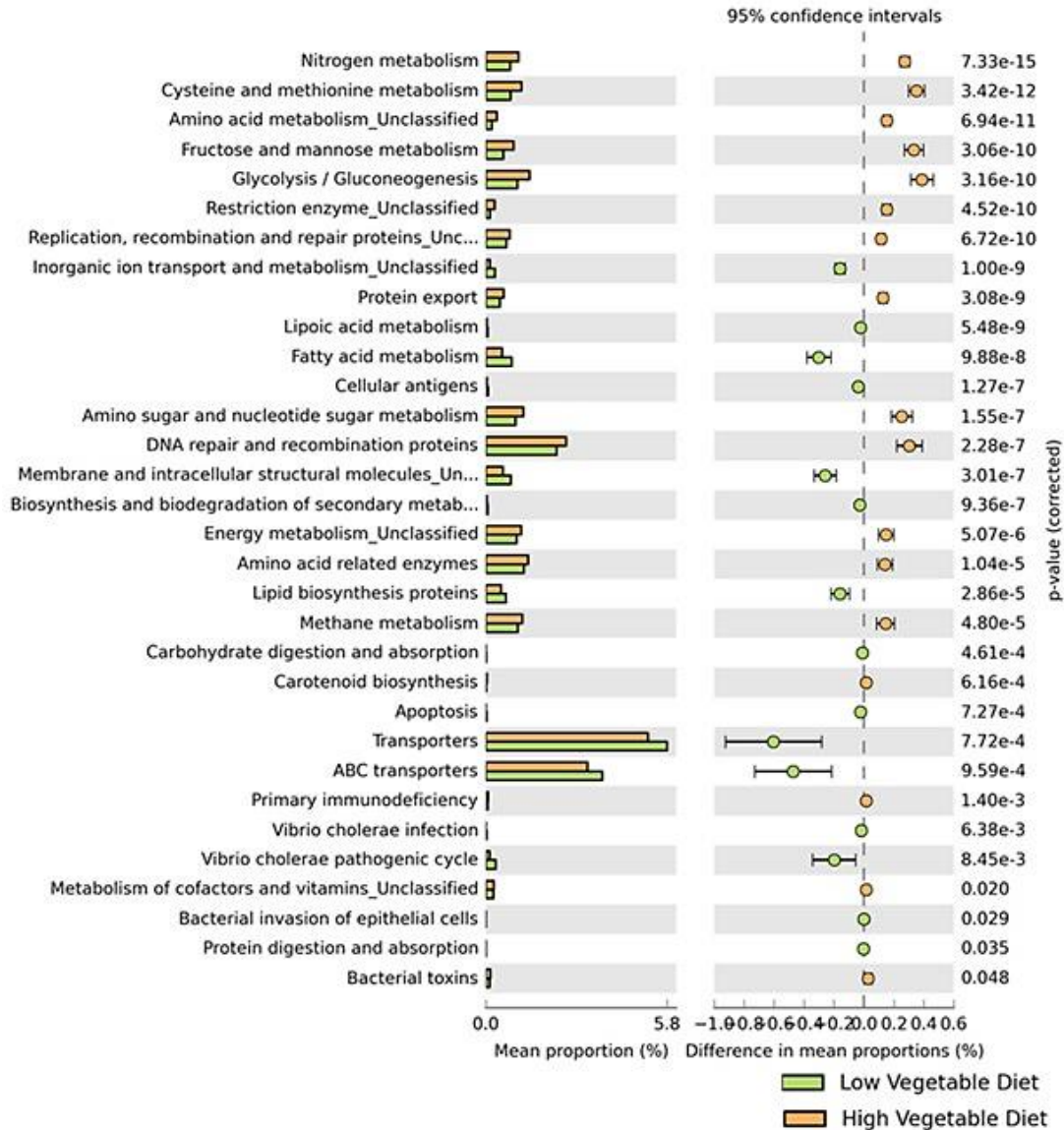


Figura 18. Predicciones PICRUST de la composición funcional en las vías KEGG de nivel 3 de la microbiota intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentadas con HV y LV. Los diagramas de barras en el lado izquierdo muestran la proporción media (%) de cada vía KEGG. Los puntos del lado derecho ilustran las diferencias en las proporciones medias (%) entre dos grupos indicados usando valores p.

En los organismos alimentados con HV+2%Q y LV en donde se observan un total de 32 vías de KEGG de las cuales un total de 25 vías fueron significativamente diferentes, destacando las vías metabólicas de aminoácidos, carbohidratos y metabolismo energético (Figura 19), al igual que la dieta HV (Figura 18).

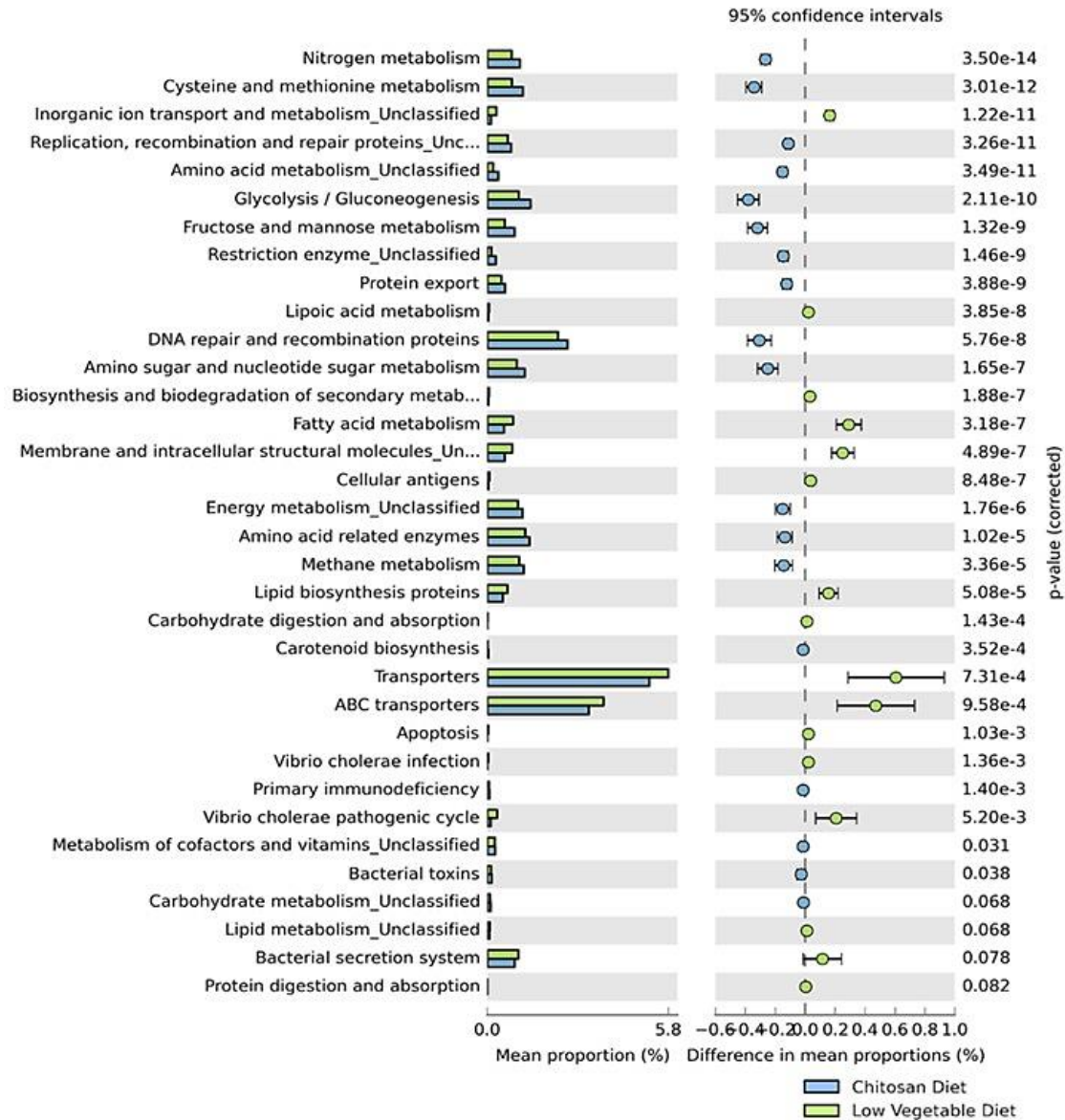


Figura 19. Predicciones PICRUST de la composición funcional en las vías KEGG de nivel 3 de la microbiota intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentadas con HV+2%Q y LV. Los diagramas de barras en el lado izquierdo muestran la proporción media (%) de cada vía KEGG. Los puntos del lado derecho ilustran las diferencias en las proporciones medias (%) entre dos grupos indicados usando valores p.

En los organismos alimentados con HV+2%Q y HV en donde se observan un total de 32 vías de KEGG, no muestran diferencias significativas, el prebiótico no tuvo un efecto en la microbiota intestinal, por lo tanto las rutas metabólicas son similares en ambos grupos (Figura 20).

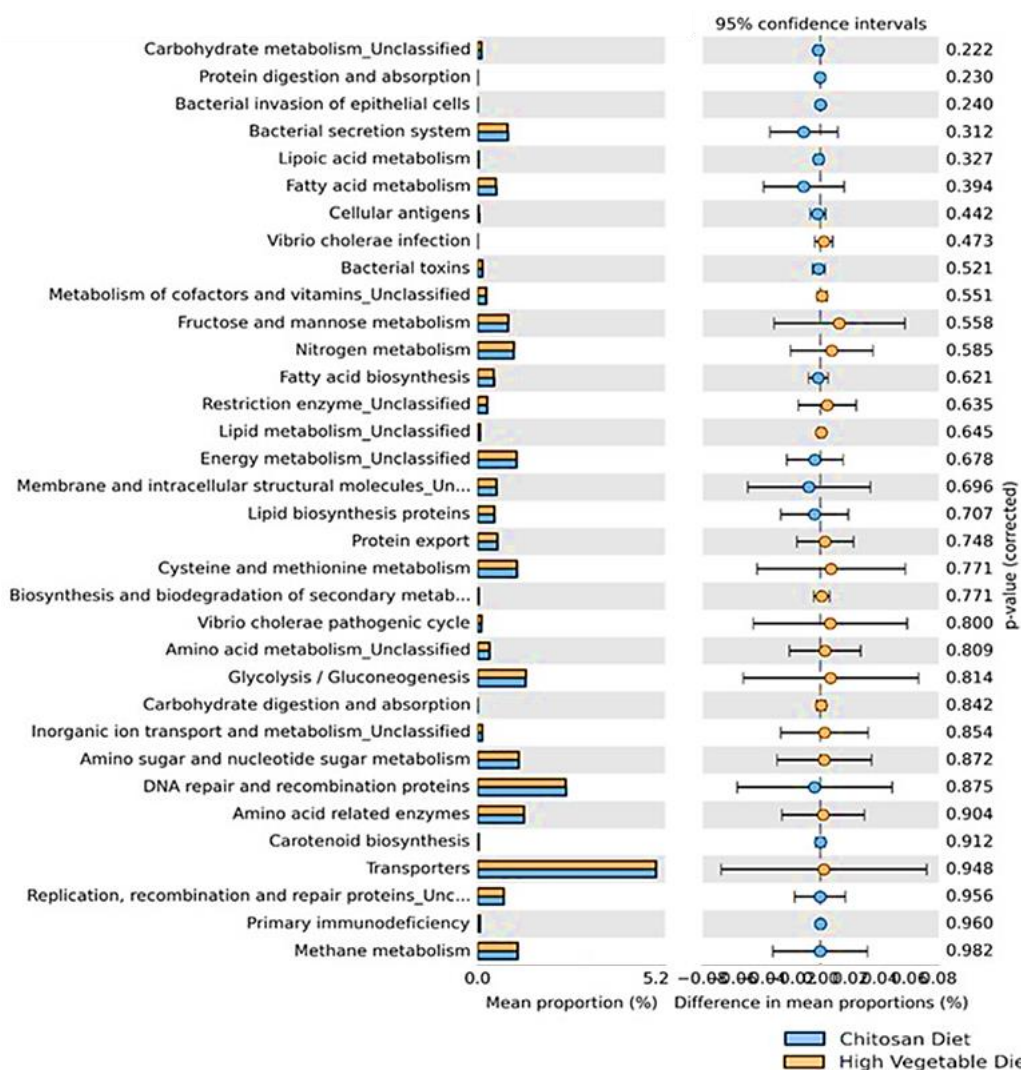


Figura 20. Predicciones PICRUSt de la composición funcional en las vías KEGG de nivel 3 de la microbiota intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentadas con HV+2%Q y HV. Los diagramas de barras en el lado izquierdo muestran la proporción media (%) de cada vía KEGG. Los puntos del lado derecho ilustran las diferencias en las proporciones medias (%) entre dos grupos indicados usando valores p.

8. DISCUSIÓN

El uso de ingredientes como soya, en dietas para peces omnívoros es muy común en acuicultura, ya que se busca el uso de recursos sustentables para el cultivo de peces. La sustitución de la harina de pescado por ingredientes vegetales, es una práctica para especies como la tilapia nilótica, tilapia híbrida y carpa común, especies para las cuales se han logrado satisfactoriamente reemplazos de 50 a 65% de ingredientes de origen animal y no se ha visto efectos adversos en el crecimiento y eficiencia del alimento. Sin embargo, se ha reportado que un reemplazo mayor a 70%, podría causar daños en la microanatomía y microbiota, los cuales son factores esenciales en la salud intestinal (Olvera-Novoa *et al.*, 2000).

Una forma de incrementar el reemplazo de harinas de pescado, por ingredientes vegetales sin afectar el crecimiento o la salud intestinal, es el uso de ingredientes funcionales, como los prebióticos, que ayuden a contrarrestar los efectos dañinos, los prebióticos poseen un gran potencial terapéutico para las enfermedades asociadas a la disbiosis (García *et al.*, 2012). El quitosano es un polisacárido prebiótico que ha mostrado efectos significativos en crecimiento y supervivencia en diversas especies (Shiau-Yu *et al.*, 1999; Meshkini *et al.*, 2012; Gopalakannan, *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se demostró que las dietas con alto contenido vegetal con y sin adición de quitosano para la alimentación de la tilapia roja *Oreochromis sp.* no afectaron negativamente el crecimiento de la especie. El rendimiento productivo de la tilapia roja alimentada con dietas con alto contenido vegetal (75% de ingredientes de origen vegetal, contenido de 39% de proteína cruda y ~9% de lípidos en base húmeda), donde se obtuvo una TCA de 1.3, TCE de 4.5 %/día y una supervivencia del 98%. Estos resultados muestran ser mejores cuando se comparan con trabajos de otros autores con especies híbridas de tilapia roja; por ejemplo, Lin *et al.* (2011) reportaron un resultado de TCA de 1.89, Supervivencia de 97.8% y TCE 2.83%/día, al alimentar juveniles de tilapia híbridas (*O. niloticus* × *O. aureus*) con dietas con una alta inclusión de vegetales (75%). Mientras que Correia *et al.* (2019) reportaron valores de TCA de 0.93, Supervivencia de 100% y TCE de 3.31%/día en juveniles del híbrido de tilapia roja *Oreochromis sp.* (*O. mossambicus* × *O. aureus*) alimentados con una dieta con 35% de proteína y un 8.5% de lípidos, así como un 8.5% de inclusión de soya.

Los resultados de los valores biológicos corporales de este estudio fueron: factor de condición (FC) de 1.57, índice viscerosomático (VSI) de 5.784 e índice hepatosomático (HSI) de 2.66. Estos resultados fueron más bajos a los obtenidos por Correia *et al.* (2019) quienes reportaron valores de índices somáticos de factor de condición de 1.2, VSI de 8.2 y HSI de 3.2 en tilapias rojas alimentadas con una dieta con 8.5% de inclusión de soya, con contenido de 35% de proteína y 8.5% de lípidos. Por su parte Cifuentes *et al.*, (2012), menciona que el factor de condición es un elemento que permite obtener información acerca del crecimiento, madurez, reproducción, nutrición y por ende del estado de salud de las poblaciones. Esta relación longitud-peso varía entre cada especie debido a la morfología y ontogenia. Es útil para comparar y cuantificar numéricamente la condición o estado en que el pez se encuentra pudiendo asociarse a una valoración de la contextura o estado de complexión corporal (Martínez-Millán, 1987). Este valor se interpreta de la siguiente forma: el resultado de FC se compara con el valor 1. Cuando FC es menor que 1, indica que las tilapias u otros peces de cultivo tienen un grado de estrés presente, mientras que cuando FC es igual o ligeramente mayor que 1, se concluye que los peces están creciendo sin estrés (Carlander, 1969; Froese, 2006). Por lo cual se destaca que en este estudio se obtuvo una buena relación longitud-peso, dado que el resultado fue mayor a 1, lo que indica que los peces mantuvieron un buen crecimiento, y no presentaron signos de exceso de grasa visceral.

En el presente estudio, la adición del quitosano no tuvo efecto significativo en el crecimiento de la tilapia roja *Oreochromis sp.* Un resultado similar fue reportado Shiau-Yu *et al.* (1999) quienes adicionaron 2, 5 y 10% de quitosano en dietas para la tilapia híbrida (*O. niloticus* x *O. aureus*), los organismos no presentaron mayor crecimiento al ser alimentadas con la dieta adicionada con 2% de quitosano.

El mejor rendimiento productivo se observó en los organismos alimentados con las dietas altas en vegetales (75% de inclusión vegetal) comparado con aquellos alimentados con la dieta baja en vegetales (14% de inclusión vegetal). Sin embargo, este resultado no puede ser atribuido por la adición de quitosano en la dieta, sino a que la tilapia roja, es una especie omnívora y tiene la capacidad de tolerar y digerir ciertas cantidades de ingredientes vegetales (Morales, 1991; Olvera-Olivera, 1996).

El reemplazo de harinas de pescado por harinas vegetales como la soya, es una práctica que se ha realizado en diferentes especies. En especies omnívoras ha tenido éxito un reemplazo del 80% al 100% en tilapia nilótica *O. niloticus* y de 65% al 75% en tilapia híbrida roja *Oreochromis sp.* Sin

embargo, altos niveles de inclusión de vegetales pueden generar problemas gastrointestinales como enteritis. Las patologías gastrointestinales han recibido mucha atención en los últimos años y han sido relacionadas con una variedad de causas infecciosas (virus, bacterias, parásitos) y no infecciosas (tóxicos, nutricionales) (Olvera-Novoa *et al.*, 2000; Lin *et al.* 2011; Mahmoud *et al.* 2014).

Los daños microanatómicos intestinales que se presentaron en la tilapia roja *Oreochromis sp.* son atribuidos a los ingredientes vegetales de la dieta. Los organismos alimentados con un 75% de inclusión de harinas vegetales en la dieta, presentaron una tendencia de inflamación en la sección proximal del intestino en los organismos alimentados con las dietas HV (control), HV+0.5%Q y LV (Figuras 5, 6 y 7), en donde se observó un aumento en la densidad de células linfocíticas, ensanchamiento de lámina propia y submucosa, y en algunos casos patologías como aumento de granulocitos eosinófilos y congestión. Estos resultados son similares a los cambios microanatómicos reportados en especies omnívoras como la tilapia nilótica Mahmoud *et al.* (2014) estudiaron la inclusión de harinas vegetales con reemplazo total de harinas de origen marino en dietas para juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), los autores reportaron patologías como enteritis, degeneración de la mucosa intestinal, disminución de actividad de enzimas digestivas y menor crecimiento de la especie. Tran-Ngoc. (2016) reportó en tilapia nilótica que a una inclusión de 80% de ingredientes vegetal de los cuales 50% era harina de soya, causa daños en la sección proximal del intestino, en donde se observó el aumento de espesor de MS y LP, también un aumento en el número de CG y EG. Estos estudios han descrito que la alimentación con un alto contenido vegetal puede causar signos patológicos en la microanatomía intestinal, tal como enteritis crónica, acortamientos de microvellosidades y deformación de vellosidades por inflamación linfocítica.

Los daños antes mencionados pueden ser atribuidos a la presencia de antinutrientes como las saponinas y lectinas, las cuales están presentes en los ingredientes de origen vegetal como la soya. Las saponinas son moléculas anfifílicas naturales que cuentan con una fracción de azúcar vinculada a un esteroide o triterpenoide denominada aglicona. Están ampliamente distribuidas en plantas silvestres y presentes en muchas plantas de cultivos agrícolas. Las saponinas tienen la capacidad de romper las membranas biológicas y están involucradas en el sistema de defensa de la planta contra bacterias. Adicionalmente, las saponinas suelen estar presentes en el rango de 1 a 5 g/kg, pero el nivel en la soya es generalmente más alto que en otros ingredientes de plantas comunes

(Anderson-Wolf 1995). Como se mencionó previamente, las saponinas son moléculas anfipáticas debido a su parte aglicona liposoluble y su cadena de sacáridos que, a su vez, es hidrosoluble. Esta característica es la base de su capacidad para formar espuma, lo cual tiende a aumentar la permeabilidad de las células del epitelio intestinal, facilitando la absorción de sustancias que normalmente se absorben, como los alérgenos, bacterias o toxinas, por lo cual desencadena una reacción inflamatoria (Johnson et al., 1986; Gee-col, 1996; Krogdahl, 2015). Las lectinas también son antinutrientes que están formadas por residuos de aminoácidos, con un alto contenido de ácido glutámico/glutamina, ácido aspártico, asparagina, serina, glicina, y bajo contenido de lisina. De acuerdo a su forma y al número de cadenas polipeptídicas se clasifican en: diméricas, tetraméricas, octaméricas y decaméricas (Brinda-col, 2005). La mayoría de las legumbres contienen de 1 a 5 g/kg de lectinas, pero el nivel en algunos pueden alcanzar los 20 g/kg (peso seco). Las lectinas tienen especificidad con algunos receptores celulares de N-acetil-d-galactosamina, y se une a la membrana del borde de cepillo intestinal, lo cual obstruye los tejidos intestinales causando alteraciones morfológicas en la pared intestinal como acortamiento en las vellosidades, inflamación y muerte celular y así mismo causar una disminución en la capacidad para la digestión y absorción de nutrientes. (Iwashita-col, 2008; Buttle, 2001; Krogdahl, 2015).

Por lo tanto, se cumple con el supuesto de que la dieta control alta en vegetales (HV) causaría daños en la microanatomía intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.*, aunque no causo ningún efecto en el crecimiento y parámetros productivos durante el experimento, tener una mala salud intestinal puede ser un factor de riesgo en la salud y supervivencia de los peces en cultivo a largo plazo.

En los grupos alimentados con la dieta HV+1%Q y HV+2%Q, se observó una evidente disminución en los grados de severidad patológica (Figuras 8 y 9). Se observa que el quitosano, logra reducir la inflamación linfocítica y redujo el ensanchamiento de lámina propia y submucosa. Aunque en este trabajo, las dietas fueron con una inclusión alta en vegetales (75%) los resultados concuerdan con los estudios en la carpa Gibel *Carassius auratus* (Chen et al., 2014), lubina *Dicentrarchus labrax* (Zaki et al., 2015), y pez blanco del caspio *Caspian kutum* (Kamali et al., 2016) en donde se reporta que al adicionar quitosano entre 0.5 y 4 % a una dieta con 20% de inclusión de ingredientes vegetales, se observó una mayor longitud de vellosidades y microvellosidades intestinales, menor grado de inflamación en lámina propia y submucosa.

Los resultados sobre la microbiota intestinal de *Oreochromis sp.* alimentados con las dietas altas en vegetales sin quitosano (HV, control) y con quitosano (HV+2%Q), no mostraron un cambio

significativo entre las comunidades bacterianas del intestino, los organismos alimentados con dietas altas en vegetales presentaron una disminución del filo Proteobacteria, y un aumento del filo Fusobacteria. En las métricas de diversidad alfa (OTUs Observados, Shannon, Chao1 y IvnSimpson, Figura 14) se encontró que las dietas HV y HV+2%Q presentaron una diversidad significativamente baja en comparación con la dieta baja en vegetales (LV), lo cual concuerda con los estudios realizados por Leyva-López *et al.* (2020), quienes realizaron un estudio en pargo *L. guttatus*, donde encontraron que al alimentar esta especie con dietas altas en vegetales, hay una ligera tendencia en la disminución de la diversidad de la microbiota intestinal transitoria, presentando un aumento en el filo de Fusobacteria. Sin embargo, declaran que se necesita más investigación para establecer el período de alimentación de los peces que modifica y altera permanentemente la microbiota, ya que esto puede variar con las especies y los ingredientes utilizados en las dietas. Michl *et al.* (2017) reportó un estudio en trucha arcoíris (*O. mykiss*) donde se muestra que la microbiota es afectada por la inclusión de proteínas vegetales en la dieta, favoreciendo la abundancia relativa de orden Lactobacillales, Bacillales y Pseudomonadales. Desai *et al.* (2012) estudiaron el efecto de las harinas de soya, canola y chícharo en la microbiota intestinal de la trucha arcoíris (*O. mykiss*), se observó una disminución en la diversidad de comunidades bacterianas, aumentando las filas de Proteobacteria, Firmicutes y Fusobacteria en los peces alimentados con las dietas de inclusión vegetal. Estos estudios se encuentran en línea al presente trabajo por la relación de las filas Proteobacteria y Fusobacteria con el consumo de dietas altas en vegetales y por la disminución observada en la diversidad alfa.

Una dieta alta en vegetales tiene un alto contenido en fibra dietética y carbohidratos, tales como celulosa, almidones y azúcares (Vásquez-Torres *et al.*, 2013). Estos compuestos pueden beneficiar el crecimiento de bacterias como las fusobacterias fermentativas de carbohidratos (Gharbia *et al.*, 2011). El filo Fusobacteria son bacterias de tipo bacilar Gram negativas y estrictamente anaeróbicas, capaces de metabolizar peptonas o carbohidratos PY-glucosa para producir ácidos grasos de cadena corta tales como el butirato, a menudo con acetato y niveles más bajos de lactato, propionato y succinato (Gharbia *et al.*, 2011). Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) comprenden en general los ácidos grasos volátiles con cadenas menores de siete carbonos (C2: Acético, C3: Propiónico, C4: Isobutírico, C4: Butírico). Estos AGCC, son moléculas producidas por las bacterias cuando fermentan los componentes de los alimentos en el colon (esencialmente la fibra) y se les relaciona con efectos a diferentes niveles. Por ejemplo, muestran efectos como el

aporte de energía a las células que se encuentran en el colon, la consolidación de la mucosa protectora del intestino, la capacidad de influir en los genes que regulan la proliferación celular y el ciclo celular, influencia en la motilidad intestinal, metabolización de la energía y podrían tener un efecto protector frente a las enfermedades metabólicas (Vergara *et al.*, 2017). Las especies del género *Fusobacterium* difieren en su capacidad para utilizar carbohidratos fermentables como fuentes de energía para el crecimiento (Robrish *et al.*, 1991). *Fusobacterium nucleatum* y otras especies utilizan glucosa para la biosíntesis de glicopolímeros intracelulares que se puede degradar para producir energía bajo condiciones de privación de aminoácidos (Robrish *et al.*, 1987; Ghabia, 2015). Esto podría deberse a que la estructura de la comunidad bacteriana fueron alteradas debido a la cantidad de ingredientes vegetales de la dieta, y no por influencia del quitosano.

En los grupos alimentados con la dieta LV se observa que la dominancia está dada por el filo Proteobacteria, en donde la familia de mayor abundancia es Vibrionaceae, esta familia es mayormente encontrada en estudios realizados en especies marinas, Gram negativas móviles, son anaerobios facultativos, tienen metabolismos tanto respiratorios como fermentativos y la gran mayoría de los vibrios requieren Na⁺ para crecer y sobrevivir, por lo general 0,5 a 3% de NaCl para un crecimiento óptimo. Esta familia tiene gran relevancia en la acuicultura debido que comprende especies probióticas y patógenas, las especies patógenas causan enfermedades en los animales acuáticos (Farmer *et al.*, 2005), siendo *Vibrio cholerae* el ejemplo más notorio como agente causante del cólera (Colwell, 2006), *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Hulsmann *et al.*, 2003; Wong y Wang, 2004). Especies como *V. harveyi* (Owens y Busico-Salcedo, 2006), *V. anguillarum* (Miyamoto-Eguchi, 1997; Crosa *et al.*, 2006) y *V. parahaemolyticus* (Austin, 2006) causan pérdidas económicas sustanciales para la industria de la acuicultura.

Los resultados reportados en el presente estudio concuerdan con lo investigaciones en diferentes especies marinas, la similitud destaca por ser especies que fueron alimentadas con dietas a base de proteína de origen animal, tanto de animales terrestres como marinos. Estruch *et al.*, (2015) demostraron que la sustitución total de harina de pescado, por ingredientes vegetales cambiaron la microbiota intestinal a nivel género en dorada (*S. aurata*), en donde *Photobacterium* y *Vibrio* fueron los géneros dominantes en las dietas a base de harinas de pescado. Michl *et al.* (2017), estudiaron el reemplazo de 0%, 50% o 97% de harinas de pescado por harinas vegetales para la alimentación de trucha arcoíris (*O. mykiss*), en el estudio se observa que en los organismos alimentados con proteínas de origen animales promovió la abundancia de bacterias del orden

Bacteroidales, Clostridiales, Vibrionales, Fusobacteriales y Alteromonadales. Recientemente Leyva-López *et al.* (2020), quienes realizaron un estudio en pargo *L. guttatus*, donde encontraron que al alimentar esta especie con dietas de origen marino y terrestre, observaron una dominancia del filo Proteobacteria y dentro de este filo la dominancia fue de la familia Vibrionaceae en la microbiota intestinal transitoria. La variación de la microbiota entre HV y LV presentadas en este estudio se atribuye a la inclusión de ingredientes vegetales en la dieta, además al periodo de alimentación, ya que fue 75 días, el tiempo prolongado a la exposición de los organismos a las dietas demostró una mayor diferencia en las poblaciones microbianas de los peces alimentados con HV y LV.

La microbiota intestinal juega un papel crucial en el mantenimiento de la salud y el metabolismo del huésped. La correlación entre la microbiota intestinal, el metabolismo de los glicolípidos y las enfermedades metabólicas ha sido bien revisada en humanos (Icaza-Chávez., 2013). Sin embargo, la interacción entre la microbiota intestinal y el metabolismo del huésped en peces aún no se comprende completamente. La dieta es uno de los determinantes más importantes que configuran el perfil de las comunidades de microbiota intestinal. Cambios en la dieta, incluidos cambios en la composición, niveles nutricionales y recursos energéticos dan forma a las comunidades de la microbiota intestinal y consigo la funcionalidad metabólica (Liu *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2020). Los organismos alimentados con dietas altas en vegetales con y sin quitosano (HV, High Vegetable Diet y HV+2%Q, Chitosan Diet), muestran que los perfiles funcionales de las vías metabólicas KEGG son similares, sin embargo estos grupos comparados con LV (baja en vegetales) muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) en la mayoría de sus perfiles metabólicos de 2do nivel (Figura 17). HV muestra que las comunidades bacterianas muestran una mayor tendencia en el perfil funcional del metabolismo de los carbohidratos y energía, esto se debe a que las dietas altas en vegetales tienen mayor cantidad de carbohidratos y fibra, lo cual favorece a las comunidades bacterianas con esta afinidad a este perfil metabólico. Los carbohidratos tienen numerosas funciones cruciales en los procesos metabólicos de los seres vivos. Los carbohidratos sirven como fuente de energía y como elementos estructurales de las células, las principales vías metabólicas de los carbohidratos son la glucólisis, glucogenólisis, gluconeogénesis y la ruta de las pentosas, además de convertir los hidratos de carbono en ácidos grasos por la vía metabólica lipogénesis de Novo. (Wiley-Liss, 2004; Melo *et al.*, 2007). Esto concuerda con la Figura 18 y Figura 19, en los se observa que a nivel 3 los grupos HV y HV+ 2%Q, tienen mayor

actividad en el perfil del metabolismo de la fructuosa y manosa, metabolismo de amino azúcares, así como mayor actividad de las vías de glicólisis y gluconeogénesis, las cuales son rutas de producción energética que se activan con la presencia de carbohidratos en la dieta. Como se mencionó anteriormente la microbiota en las dietas HV y HV+2% estaba compuesta por una mayor abundancia del filum Fusobacteria, los miembros de este filum no solo utilizan los carbohidratos como fuente energética, además los fermentan para producir ácidos orgánicos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) tales como ácido acético, propiónico, butírico, fórmico o succínico, dependiendo de la especie bacteriana y el sustrato, estos metabolitos aportan gran cantidad de energía al organismo ya que los ácidos grasos de cadena corta sirven de fuente de energía a las células que se encuentran en el tracto gastrointestinal, tienen efecto en la consolidación de la mucosa protectora del intestino y además, tienen la capacidad de influir en los genes que regulan la proliferación celular y el ciclo celular (por el que las células se preparan para dividirse y duplicar su ADN). Entre los AGCC, se informa que el butirato acomoda del 10% al 15% de la energía requerida por el huésped y puede reparar la mucosa intestinal dañada, mientras que el acetato y el propionato están involucrados en el metabolismo energético del hígado (Duncan-col., 2004 ; Tremaroli *et al.*, 2012), por esta razón puede deberse que el metabolismo energético tenga mayor actividad en la microbiota intestinal de los organismos alimentados con HV y HV+2%Q.

Wei *et al.*, (2018), reportaron que el perfil metabólico de microbiota intestinal en besugo rojo (*Megalobrama amblycephala*) durante transición de hábitos de alimentación de zooplankton a dietas herbívoras, tiene influencia en las vías relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos (almidón y sacarosa, fructosa y manosa, glioxilato y dicarboxilato, ciclo del citrato, glucólisis / gluconeogénesis y pentosa fosfato). Leyva-López *et al.*, (2020), reportaron que el perfil funcional KEGG en 2 nivel de la microbiota intestinal del pargo *L. guttatus* alimentados con dieta a base de ingredientes vegetales tuvo un efecto al aumentar la proporción de bacterias con el perfil funcional metabólico de carbohidratos, energía y aminoácidos. Estos estudios concuerdan con el presente trabajo, ya que al alimentar con las dietas altas en vegetales (HV y HV+2%Q) tienen un efecto relevante en el perfil funcional del metabolismo de los carbohidratos y energía.

Los organismos alimentados con dietas bajas en vegetales, mostraron que el perfil funcional de la microbiota intestinal favorece el metabolismo de los aminoácidos, motilidad celular y metabolismo lipídico (Figura 17). Esta diferencia con HV y HV+2%Q puede deberse a que los ingredientes vegetales como la soya, pulido de arroz y sorgo, que son harinas de granos enteros o desengrasados,

contienen gran cantidad de antinutrientes como ácido fítico e inhibidores de proteasas, que son sustancias que impiden el uso o metabolismo enzimático de las proteínas, lo cual dificulta la digestión proteica de la dieta (Krogh, 2015). Esto tiene efectos negativos en el metabolismo de los aminoácidos, por ello este perfil funcional mencionado es bajo en la microbiota de los organismos alimentados con dietas altas en vegetales. Las proteasas (o peptidasas) son enzimas fundamentales en el control de una gran variedad de procesos fisiológicos en el organismo. Sus funciones son catalizar la ruptura de enlaces peptídicos, la hidrólisis de proteínas, permitiendo su digestión y utilización de los aminoácidos (De Leo *et al.* 2002). La dieta LV contenía menor cantidad de ingredientes vegetales y en consecuencia menor cantidad de inhibidores de proteasas, por lo cual el metabolismo de proteínas o bien aminoácidos es mayor que en las dietas altas en vegetales.

9. CONCLUSIONES

La alta inclusión de ingredientes vegetales en la dieta para tilapia roja *Oreochromis sp.* no afecta el crecimiento y supervivencia de la especie, lo que demuestra el potencial del uso de ingredientes alternativos de bajo costo para la alimentación de tilapia roja, sin embargo, si causa algunos efectos dañinos en la microanatomía intestinal y disbiosis en la microbiota intestinal.

La adición de quitosano a las dietas altas en vegetales no tiene un efecto en los parámetros productivos de la tilapia roja *Oreochromis sp.* sin embargo puede ser utilizado como aditivo en dietas con alto contenido vegetal y contrarrestar o mitigar los daños en la microanatomía intestinal de la tilapia roja

La estructura de la comunidad bacteriana de la tilapia roja *Oreochromis sp.* cultivada en condiciones experimentales en agua de mar (34 ups) se ve afectada al alimentar con dietas altas en vegetales (75% de inclusión de vegetales), en donde se observaron diferencias significativas en las diferentes métricas que definen la microbiota intestinal (abundancia, diversidad alfa y beta), comparado con las dietas bajas en vegetales LV.

Los cambios observados en la diversidad y estructura de la microbiota intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.* alimentados con HV y HV+2%Q, fueron afectados por la naturaleza de la dieta, dada la alta inclusión de ingredientes vegetales por la sustitución de fuentes de proteínas de pescado y no se observan efectos significativos al incluir quitosano a estas dietas.

10. RECOMENDACIONES

Existe una amplia área de investigación sobre la solución a los daños ocasionados en la alta inclusión de harinas vegetales, debido a lo importante que es mantener un bienestar animal en los cultivos acuícolas, cubriendo necesidades nutricionales y de salud, hay alimentos con diversos alimentos funcionales que pueden ser empleados para disminuir este impacto, y así tener alimentos balanceados con costos rentables e ingredientes sustentables, en esta investigación se sugiere observar los daños ocasionados por dietas altas en harinas vegetales a diferentes intervalos de tiempo y a diferentes inclusiones vegetales (de un 30% a 90%), para poder mediante un análisis dosis-respuesta encontrar la dosis de quitosano e inclusión vegetal más efectiva para diferentes especies, así como realizar un análisis de rentabilidad de los costos de alimentación con la producción de estas dietas a escala industrial.

Evaluar el quitosano en dietas altas en vegetales en organismos con hábitos carnívoros, que son especies que presentan más daños en salud intestinal, por la alimentación con estos ingredientes, el campo es amplio, seguir descubriendo e innovando nos abrirá las puertas hacia la producción de alimentos rentables y sustentables para la acuicultura.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo A.E. & Wells M.R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. Department of Food and Nutrition, State University of Campinas, Brazil.
- Baeverfjord G. & Krogdahl A. (1996). Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*. 19: 375-387.
- Bajaj, M.; Winter, J. & Gallert, C. (2011). Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from Crangon crangon shrimp waste, *Biochemical Engineering Journal*. 51– 62.
- Bowler B., Rosales E., Ching C. , Quispe M., (2011). BIÓTICOS – EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INTESTINAL. *Boletines Nicovita*.
- Cadeza-Espinosa, Brambila-Paz M., Chalita-Tovar J., L. Eduardo & González-Estrada A. (2017). Evaluación financiera con la metodología de opciones reales de una inversión para producir quitosano con base en desperdicio de camarón. *Agricultura, sociedad y desarrollo*. 533-545.
- Cahil, M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: A review. *Microb. Ecol*. 19: 21–41.
- Cao W., Zhang, C., Hong, P., Ji, H., Hao, J. & Zhang, J. (2009). Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate, *LWT - Food Science and Technology*. 42: 244–249.
- Castañeda Ramírez C., Fuente Salcido N. M., Pacheco Cano R., Ortiz-Rodríguez T. & Barboza Corona J.E. (2011). Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. *Acta Universitaria*. 21(3): 14-23.
- Castillo, L. F. (2001). Tilapia roja (2001). Una evolución de 20 años, de la incertidumbre al éxito doce años después. Cali (valle), Colombia. 5-89.
- Chen Y., Zhu X., Yang Y., Han D., Jin J. & Xie S. (2014). Efecto del quitosano dietético sobre el crecimiento, hematología, respuesta inmune, morfología intestinal, microbiota intestinal y resistencia a enfermedades en la carpa gibel (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture Nutrition*. 20: 532-546.
- CONAPESCA. (2014). Anuario estadístico de acuicultura y pesca .México, D.F. Comisión nacional de acuicultura y pesca. Consultado en julio 2012. Recuperado en: www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2012.
- CONAPESCA. (2020). Produjo México 47 mil 664 toneladas de camarón en la temporada de captura 2019-2020: Agricultura. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Recuperado en: <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/produjo-mexico-47-mil-664-toneladas-de-camaron-en-la-temporada-de-captura-2019-2020-agricultura?idiom=es>.
- Crini, G. (2005). Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science*. 30: 38-70.

- Cruz-Leyva M. C., Zamudio-Maya M., Corona-Cruz A. I., González-de la Cruz J. U. & Rojas-Herrera R. A. (2014). IMPORTANCIA Y ESTUDIOS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN LOS RECURSOS Y PRODUCTOS PESQUEROS. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 2: 99-115.
- De Leo F., Volpicella M., Licciulli F., Liuni S, Gallerani & Ceci LR. (2002) PLANT-Pls: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Oxford University Press*. 30(1): 347-348.
- Desai, A. R., Links, M. G., Collins, S. A., Mansfield, G. S., Drew, M. D., Van Kessel, A. G., & Hill, J. E. (2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 350: 134-142.
- Domínguez-Vergara A. M., Vázquez-Moreno L. & Ramos-Clamont Montfort G. (2009). Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 59(4):1-16.
- El-Sayed & Abdel-Fattah M. (1999). Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.*. *Aquaculture*. 179: 149–168.
- Escobar-Briones L., Olvera M. A. & Puerto C. (2006) Avances sobre la ecología microbioana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L.
- Estruch, G., Collado, M. C., Peñaranda, D. S., Vidal, A. T., Cerdá, M. J., Martínez, G. P. & Martinez-Llorens, S. (2015) Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus Aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLOS ONE*. 8: 1-10.
- FAO. (2017). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2017. Visión general del sector acuícola nacional: Colombia. Item II Desempeño del sector. Recuperado de: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_colombia/es#tc-N700C5.
- FAO. (2018). Estado mundial de la pesca y la acuicultura, cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>.
- Fitzsimmons K. (2010). Potential to Increase Global Tilapia Production. *Global Outlook for Aquaculture Leadership*, Kuala Lumpur, 35: 1-25.
- Fraga I., Flores E., Reyes R. & Llanes Y. (2012). Efecto de diferentes densidades de siembra en el engorde de tilapia roja (*oreochromis mossambicus x o. aureus*) en jaulas colocadas en la bahía de casilda, cuba/effect of different stock densities on growing of red tilapia (*oreochromis mossambicus x o. aureus*). 32(1):1-28.
- Giraldo Pedraza J. (2015). PROPIEDADES, OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DEL QUITOSANO. 22.
- Gopalakannan A. & Arul V. (2006). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*. 179–187.
- Guarner F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*. 22;14-19.

- Haygood, A.M. & Jha, R. (2016) Strategies to modulate the intestinal microbiota of Tilapia (*Oreochromis sp.*) in Aquaculture. *Aquaculture*. 00: 1–14.
- Hernández C., Olvera - Novoa M. A., Hardy R.W., Hermosillo A., Reyes C. & González B. (2010). Sustitución completa de la harina de pescado por harinas de subproductos porcinos y avícolas en dietas prácticas para alevines de tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus*: digestibilidad y rendimiento del crecimiento. *Aquaculture Nutrition*. 16: 44-53.
- Isolauri E., Sütas Y., Kankaanpää P., Arvilommi H. & Salminen S. (2001). Probióticos: efectos sobre la inmunidad. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 444-450.
- Kamal G., Abu Hena Md. & Mair C. (2005). Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. *Aquaculture*. 247(4): 189-201.
- Kamali Najafabad M., Imanpoor M. R., & Taghizadeh V. (2016) Efecto del quitosano dietético sobre el rendimiento del crecimiento, parámetros hematológicos, histología intestinal y resistencia al estrés de alevines de kutum del Caspio (*Rutilus frisii kutum Kamenskii*, 1901). *Fish Physiol Biochem*. 42: 1063–1071.
- Kassai M., Gérard Charlet & Joseph Arul (2000). Master curve for concentration dependence of semi-dilute solution viscosity of chitosan homologues: The Martin equation. *Food research international*. 33: 63-67.
- Kneifel-Domig, Ghanbari M., Wolfgang K., Konrad J. & Domiga (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*. 448: 464-475.
- Kong XF., Zhou XL., Lian GQ., Blachier F., Liu G., Tan BE. (2014). La suplementación dietética con quitooligosacáridos altera la microbiota intestinal y modifica los metabolitos luminales intestinales en lechones pequeños de Huanjiang destetados. *Ciencia Ganadería*. 160; 97–101.
- Kroghdahl A., Penn M., Thorsen J., Refstie S. & Bakke A. M. (2015). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*. 41(3):333-344.
- Lee H., Park Y., Jung J., Shin W. (2002). Los oligosacáridos de quitosano, dp 2-8, tienen efecto prebiótico sobre *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus sp.* *Anaerobe*, 8 (6); 319 –324
- Leyva-López N., Osuna-García E., Hernández c. & Gómez-Gil1 B., Soto-Rodríguez S. & Guerrero A. (2020). A preliminary study of the effect of total fishmeal replacement with different dietary sources on the gut microbiota of spotted rose snapper juvenile (*Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869). *Aquaculture Research*. 00: 1-14.
- Lin S., Yu P., Lin L. & Li L. (2011). Effects of dietary b-1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish & Shellfish Immunology*. 31: 788-794.
- Liu Y., Ma L., & Gao C. (2012). “Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering”. *Mater. Sci. Eng. C*. 32(8): 2361–2366.
- Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J., Hu X. & Han C. (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 24(26): 4833–4841.

- Mahmoud M. A., Kilany O. E. & Dessouki A. A. (2014). Effects of Fish Meal Replacement with Soybean Meal and Use of Exogenous Enzymes in Diets of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) on Growth, Feed Utilization, Histopathological Changes and Blood parameters. *Life Science Journal*. 11: 6-18.
- Mcmurdie, Paul & Holmes, Susan. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PloS one*. 8. e61217. 10.1371/journal.pone.0061217.
- Melo V. & Cuamatzi O. (2007). Bioquímica de los procesos metabólicos. 1era edición, Editorial REVÉRTE, S.A. Cap. 4 Carbohidratos: estructura y función biológica. 41-73.
- Mena-Herrera A., López S. H. & Macías Zamora R. (2002). Efecto de la salinidad en el crecimiento de tilapia híbrida *Oreochromis mossambicus* (Peters) × *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), cultivadas bajo condiciones de laboratorio. *Veterinaria México*. 33(1): 39-48.
- Meshkini S., Ali-Akbar T., Tukmechi A. & Farhang-Pajuh F. (2012). Effects of chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Res Forum*. 49-54.
- Michl S. C., 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. Diet-dependent gut microbiome of juvenile rainbow trout. *PLOS ONE*. 3:1-21.
- Montilla A., Moreno F. J., Villamiel M., Olano A. & Corzo N. (2010). Obtención de ingredientes alimenticios de carácter prebiótico. *Avances en la Investigación de la Alimentación Funcional*. 145-148.
- Morales D. A. (1991). La tilapia en México: biología, cultivo y pesquerías. *Tilapia, Fish-culture, Cultivos (biología)*. 186-190.
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. *M&T-Manuales y Tesis SEA*. 1: 84.
- Nordrum S., Bakke-McKellep A. M., Krogdahl A. & Buddington R.K. (2000). Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 123: 317-335.
- Oliva-Teles, A., Enes, P., & Peres, H. (2015). Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. 203-233.
- Olvera-Novoa M. A. & Olivera-Castillo L. (2000). Potencialidad del uso de las leguminosas como fuente proteica en alimentos para peces. *Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Symposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 327-348.
- Parada. (2004). Caracterización de quitosano por visco simetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5-13.
- Peniche, C.; Arguelles, W.; Gallardo, A.; Elvira, C., Román, J. (2001). Quitosano: un polisacárido natural biodegradable y biocompatible con aplicaciones en biotecnología y biomedicina. *Revista Plásticos Modernos*. 81: 81-91.
- Pérez, Romeu, Lastre, Morales, Cabrera, Reyes, González, Sifontes & Pérez. (2014). Inmunopotenciadores para la acuicultura. *Centro de Bioactivos Químicos (CBQ)*.

Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. *VacciMonitor*. 23: 24-31.

- Ramos-Pita J. U. (2019). Proyecto de inversión y desarrollo de una estación de reproducción de peces de agua dulce en el parque nacional El Cajas. Maestría en Contabilidad y Auditoría, Guayaquil. ULVR.
- Rinaudo M. (2006). “Chitin and chitosan: Properties and applications”. *Prog. Polym. Sci.* 31(7): 603–632.
- Sánchez-Rodríguez J. E. (2013) Efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado por una mezcla de krill-soya en la dieta de juveniles de pargo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología UNAM Unidad Académica Mazatlán. 1-59.
- Shiau S. Y. & Yu Y. P. (1999). Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* $\times$ *aureus*. *Aquaculture*. 179: 439–446.
- Shiau-Huang. (1989). Optimal dietary protein level for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus*) reared in seawater. *Aquaculture*. 81(2): 119-127.
- Suárez J. E. (2013). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria*. 28: 38-41.
- Sugimoto k. (1999). Preparation and characterization of chitin and chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 36: 49-59.
- Tirado Osuna J. R. (2019). Evaluación del efecto de quitosano utilizado como prebiótico sobre dietas formuladas a base de proteína vegetal para robalo blanco del pacífico (*Centropomus viridis*): efecto sobre crecimiento y supervivencia. Grado de Licenciatura. CIAD A.C. Unidad Mazatlán - Instituto Tecnológico de Mazatlán, Sinaloa.
- Urán A.A., Gonçalves J.J., Taverne-Thiele J.W., Schrama J.A.J. & Verreth (2008). Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 25(6): 751-760.
- Van den Ingh, Krogdahl Å., Olli J.J., Hendriks H.G.C.J.M. & Koninkx J.G.J.F. (1991). Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture*. 94(4): 297-305.
- Verschuere L., Rombault G., Sorgeloos P. & Verstrae W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 4655-671.
- Villarruel-Castillo L. W., Angel Armas J. A. & Céspedes P. (2011). Efectividad de dos eclosionadores prototipo en la eclosión de ovas de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) y tilapia negra (*Oreochromis niloticus*) en Yahuarcocha Imbabura. Universidad Técnica del Norte.
- Wiley-Liss & Hoboken (2004). Metabolismo energético humano del SC. del Greenway en salud y enfermedad. En: Piso KB, editor. *Metabolismo funcional: Regla y adaptación.*; págs. 251-259.
- Wong S., Waldrop T., Summerfelt S., Davidson J., Barrows F., Kenney P., Welch T., Gregory D., Snekvik K., John F. & Goodd C. (2013). Aquacultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Possess a Large Core Intestinal Microbiota That Is Resistant to Variation in Diet and Rearing Density, *Applied and Environmental Microbiology*. *Journal ASM*. 79: 4974 – 4984.

- Zaki M. A., El-S M., Salem, Gaber M. M. & Nour A. M. (2015). Effect of Chitosan Supplemented Diet on Survival, Growth, Feed Utilization, Body Composition & Histology of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). World Journal of Engineering and Technology. 38-47.
- Zarkasi K. Z., Richard S., TaylorGuy C. J., Tamplin B., Glencross J. & Bowman P. (2016). Microbial Ecology. 71(3): 589–603.

12. ANEXOS

Anexo 1

Cuadro 11. Sistema de puntuación semicuantitativa para los diferentes parámetros utilizados para evaluar el grado de enteritis desarrollada por el salmón del Atlántico alimentado con una dieta a base de harina de soja. Adaptado de Urán et al. 2008.

Puntuación	Apariencia
Pliegues de la mucosa (PM)	
1. Longitud basal; Los pliegues simples y complejos de la mucosa aparecen largos y delgados. La ramificación lateral del pliegue se muestra delgada. 2. Algo de contracción e inflamación; Los pliegues mucosos simples tienen una longitud media. Los PM todavía son largos pero parecen más gruesos. 3. Contracción difusa y aparición de disrupción tisular; Los pliegues simples tienen longitud corta a media. Las ramas laterales en la PM son muy cortas y gruesas. 4. Disrupción tisular difusa; Los PM simples son gruesos y cortos son más frecuentes. Casi no hay ramas laterales en los pliegues. 5. Interrupción total del tejido; Tanto los pliegues complejos como los simples parecen muy engrosados.	
Vacuolas supranucleares (SNV)	
1. Tamaño basal del SNV; Las grandes vacuolas ocupan casi toda la parte apical de los enterocitos. 2. Alguna reducción de tamaño; vacuolas de tamaño mediano, que ocupan menos de la mitad de los enterocitos. 3. Reducción de tamaño difusa; vacuolas de pequeño tamaño cerca de la membrana apical en la mayoría de los enterocitos. 4. Inicio de la extinción de SNV; Pequeñas vacuolas dispersas todavía están presentes en algunos enterocitos.	
Células caliciformes o células goblet (GC)	
1. Células dispersas. 2. Mayor número de GC y escasa distribución. 3. Número difuso de GC y ampliamente difundidos en los pliegues. 4. GC densamente agrupadas. 5. células altamente abundantes y compactas.	

Granulocitos eosinofílicos (EG) 1. Pocos o ninguna en SM. 2. Mayor número en SM y algo de migración a LP. 3. Mayor migración a LP. 4. Número difuso en LP y SM, engrosamiento y deformidad de la LP. 5. EG denso en LP y SM, engrosamiento y deformidad de la LP y SM.
Lamina Propia (LP) 1. Tamaño normal LP; Se observa en los pliegues de forma delgado y con tejido conectivo delicado en todos los pliegues simples. 2. Mayor tamaño de LP; La lámina propia parece un poco más clara y robusta en algunos de los pliegues. 3. LP de tamaño mediano; Aumento claro de la lámina propia en la mayoría de los pliegues simples. 4. LP grandes; lámina propia gruesa en muchos pliegues. 5. LP más grande; Lámina propia muy engrosada en muchos pliegues, causando deformidad del pliegue.
Mucosa sub-epitelial (SM) 1. SM normal; Capa muy delgada de tejido conectivo entre la base de los pliegues y el estrato compacto. 2. Tamaño aumentado SM; Cantidad ligeramente aumentada de tejido conectivo debajo de algunos de los pliegues de la mucosa. 3. SM de tamaño mediano; Aumento claro del tejido conectivo debajo de la mayoría de los pliegues de la mucosa. 4. SM grandes; Capa gruesa de tejido conectivo debajo de muchos pliegues. 5. SM más grandes; Capa gruesa extrema de tejido conectivo debajo de la mayoría de los pliegues.

Anexo 2

Cuadro 12. Sistema de puntuación semicuantitativa de la severidad de infiltración de linfocitos en el tejido intestinal de la tilapia roja *Oreochromis sp.*

score	Apariencia
Linfocitos (LF) 1. Células dispersas en lámina propia (LP), escasa distribución. 2. Mayor número de LF en lámina propia. 3. Mayor migración de LF a lámina propia y área de enterocitos. 4. Número difuso en lámina propia y sub-mucosa(SM), engrosamiento LP. 5. LF distribuidas de forma densa en LP y SM, engrosamiento y deformidad de la LP, SM, y área de enterocitos.	

Grados de severidad en microanatomía intestinal observada en tilapia roja *oreochromis sp.* alimentadas con dietas altas en vegetales (75% de inclusión vegetal).

Las siguientes Figuras (22-26) representan los grados de severidad de la inflamación linfocítica.

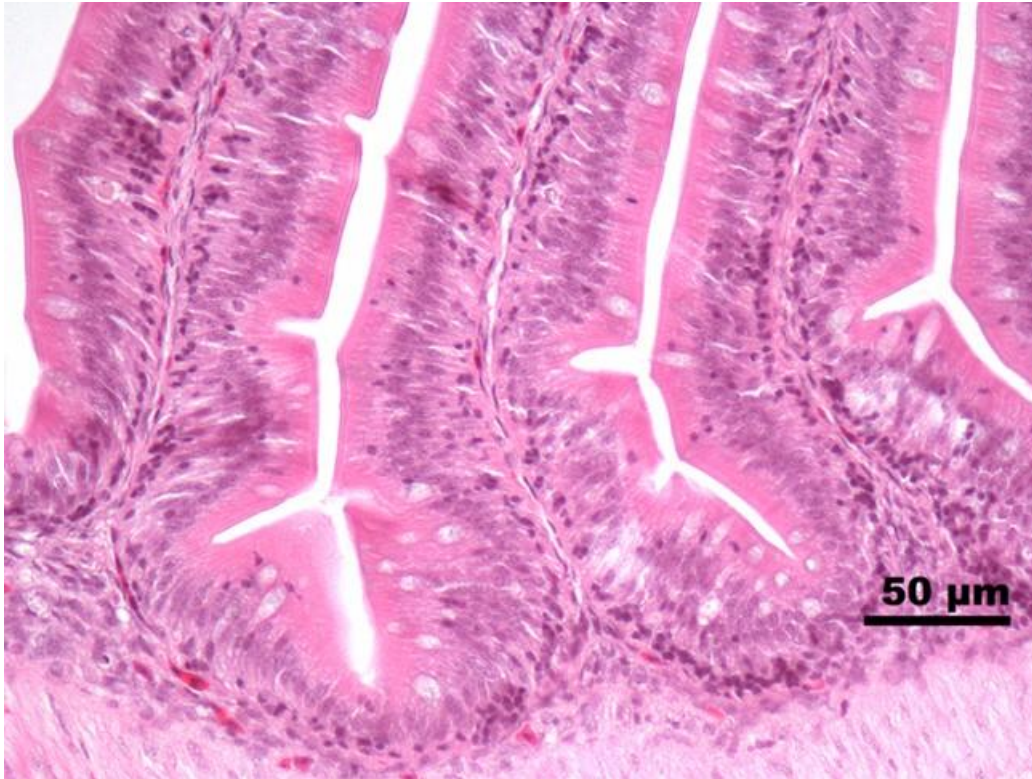


Figura 21. Grado 1 de inflamación linfocítica, Células dispersas en lámina propia, escasa distribución (estado normal).

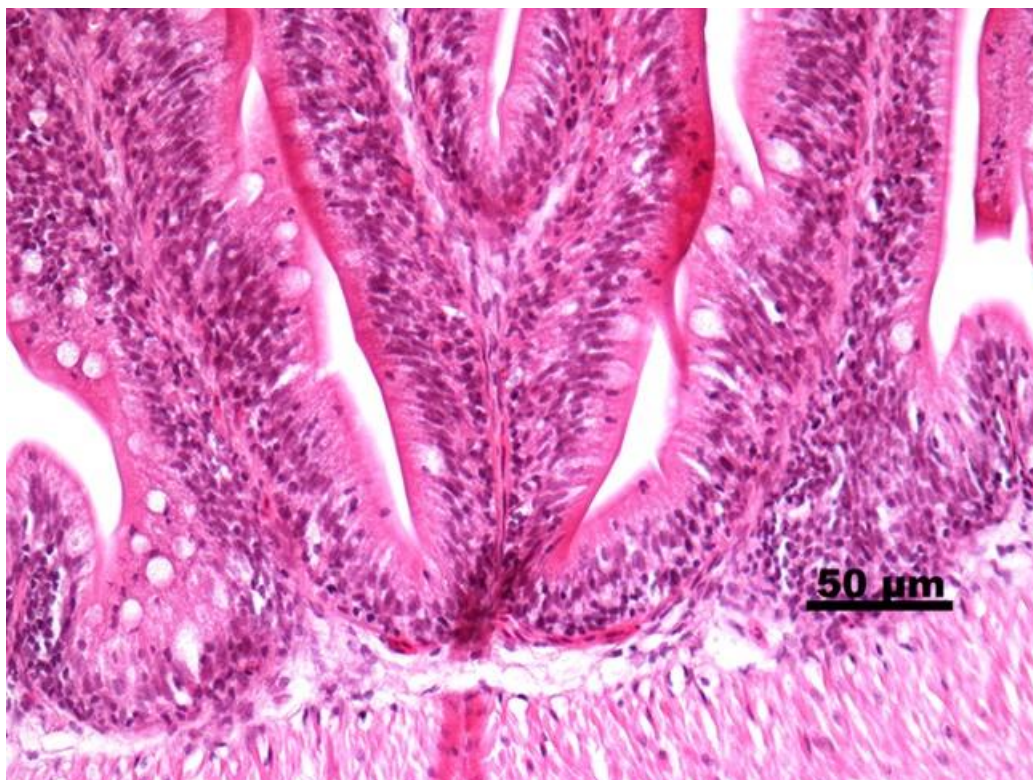


Figura 22. Grado 2 de inflamación linfocítica, mayor número de LF en lámina propia.

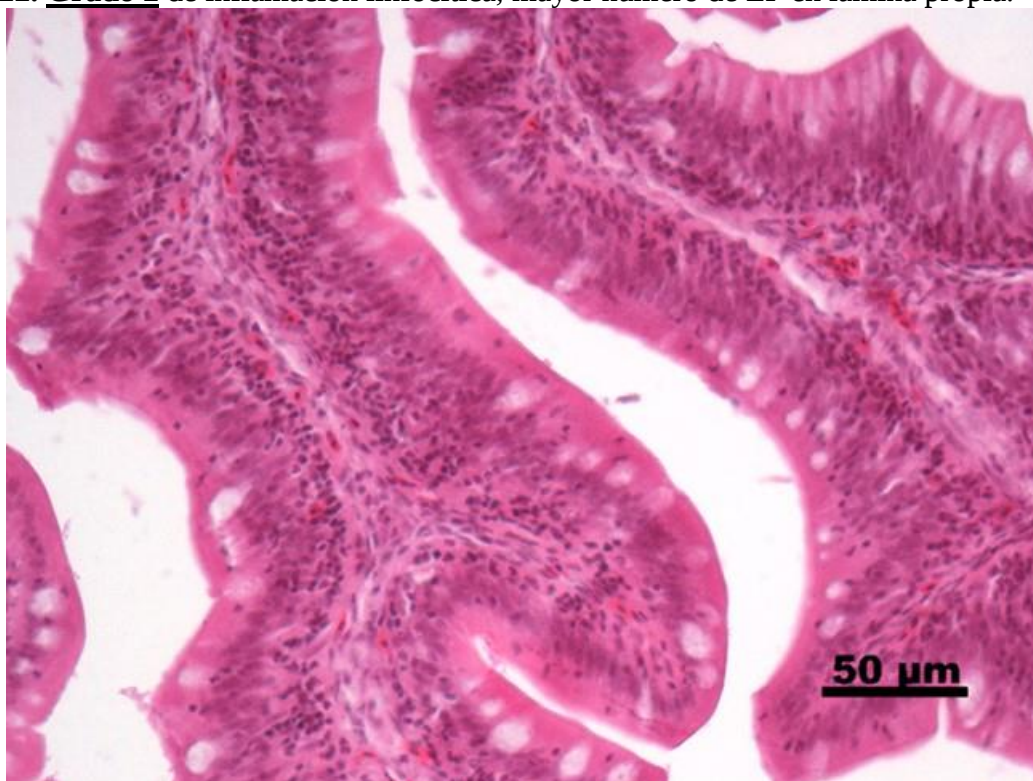


Figura 23. Grado 3 de inflamación linfocítica, mayor migración de LF a lámina propia y área de enterocitos.

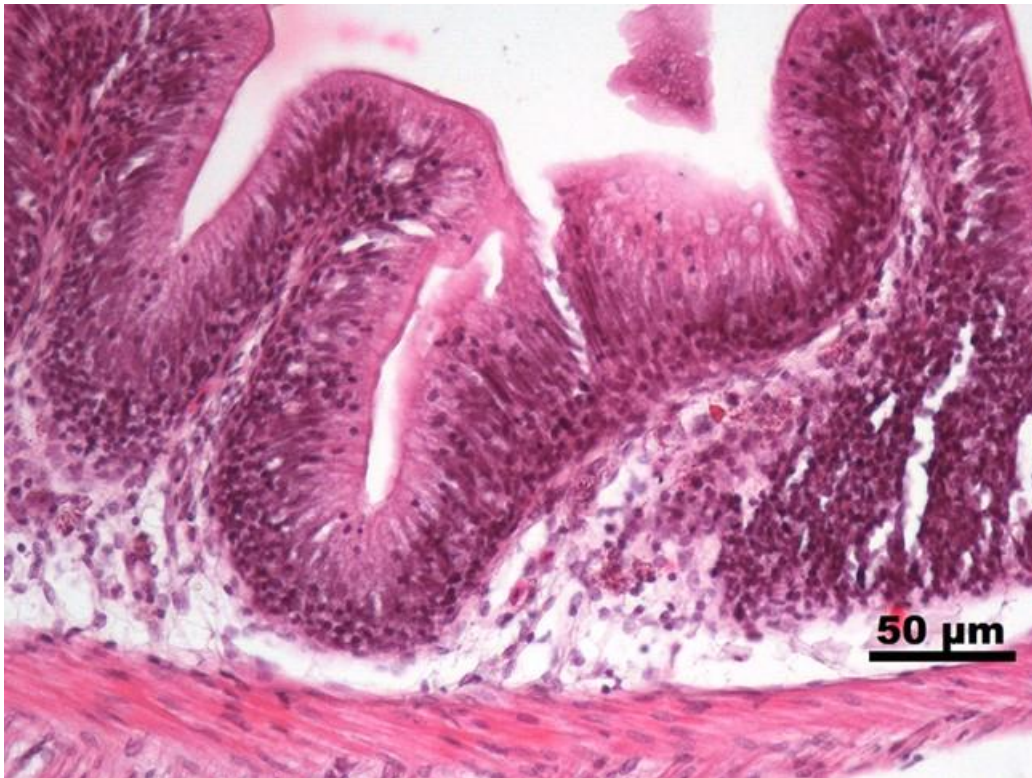


Figura 24. Grado 4 de inflamación linfocítica, Número difuso en lámina propia y sub-mucosa, engrosamiento LP.



Figura 25. Grado 5 de inflamación linfocítica, LF distribuidas de forma densa en LP y SM, engrosamiento y deformidad de la LP, SM, y área de enterocitos.