



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

**EFFECTO DE LA DIETA EN LA MICROBIOTA INTESTINAL  
DEL PARGO FLAMENCO *Lutjanus guttatus*  
(Steindachner, 1869)**

Por:

IBT. Elizabeth Osuna García

TESIS APROBADA POR LA:

UNIDAD MAZATLÁN  
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

La información generada en esta tesis 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 del autor, 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 del Director 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 de tesis.

---

Dr. Pablo Wong González

Director General

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de IBT. Elizabeth Osuna García, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.



Dra. Crisantema Hernández González  
Director de Tesis



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala  
Asesor



Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez  
Asesor



Dr. Juan Manuel Martínez Brown  
Asesor

## AGRADECIMIENTOS

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

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Mazatlán a través del Posgrado en Ciencias Acuicultura y Manejo Ambiental** por la oportunidad para llevar a cabo mis estudios de maestría en su programa de posgrado y todas las facilidades brindadas en mi estancia e investigación.

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

A los miembros de mi comité: Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez, Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, Dr. Juan Manuel Martínez Brown. Por su paciencia, observaciones, recomendaciones y sugerencias para que este trabajo llegara a buen término y se cumpliera con la finalidad del programa. Muchas Gracias.

Al Coordinador de Posgrado, Dr. Pablo Almazán Rueda, que nos aguantaste durante este lapso, siempre al pendiente y escucharme cuando necesité un consejo o una palabra de aliento.

A la Biol. Patricia Domínguez Jiménez, por su apoyo en las actividades desarrolladas dentro y fuera del laboratorio de nutrición, por su disposición siempre a facilitarme lo que necesité que estuvo en sus manos.

Al M. en C. Erik Navarro, por tu acompañamiento durante el análisis bioinformático, estar siempre disponible para sacarme de dudas y darme ánimos.

A la M. en C. María del Carmen Bolán por adoptarme como una integrante más del laboratorio de bacteriología, por su paciencia, sus consejos y su amistad durante este largo trayecto que compartimos.

A la Ing. Francis Isela Marrujo López, por todo el apoyo que me brindaste en tiempo de crisis, la confianza depositada en mi para usar tu lugar de trabajo a pesar de no estar presente, de corazón muchas gracias.

A la IBQ. Julissa Enciso Ibarra, por todo el tiempo que le dedicaste a mis muestras y a mi persona en cada cosa que necesité en el laboratorio de genómica, molestarte en tiempo que no era de trabajo y demás, por tener siempre una actitud de apoyo hacia mi y a que saliera el trabajo, muchas gracias July.

A todas las personas que hicieron posible que mi estancia en esta institución fuera agradable:

A mis compañeros de generación Dennise, Karen, Sara, Alberto (Piña), Germán por el apoyo y convivencia durante esta experiencia.

A mis compañeros de laboratorio Dr. Emyr Saúl Peña, M. en C. Cynthia Esmeralda Lizárraga Velázquez, M. en C. Alejandra Marcos López, por todo su apoyo y convivencia durante estos años.

A la IBT. María García González, por tu disposición a apoyarme durante el bioensayo y tu acompañamiento en tiempos de crisis.

A todos quienes en su momento fueron mis profesores y amigos, que contribuyeron con su granito de arena para que mi conocimiento se acrecentara.

Al personal administrativo que siempre estuvieron disponibles para apoyarme y facilitarme lo que necesité de su área.

## DEDICATORIA

*A mi ser supremo que día a día me da el entendimiento y la voluntad para avanzar en mi camino en cumplimiento de la misión de vida que ha designado para mí.*

*Especialmente dedico esta tesis a mis padres, que siempre confían en mis decisiones y me apoyan para que logre las metas que me propongo ¡Mis logros son sus logros!*

*A mis hermanos Cristian Luis y Jesús Heriberto, que siempre en momentos de debilidad o cansancio han sabido inyectarme su entusiasmo y me han acompañado a lo largo de este camino que se llama vida.*

*A mis amigas Claudia, Suggey, Marcela, Aglaee, Judith que con su ejemplo de superación influyeron en mí para decidirme a emprender esta aventura.*

## Contenido

<b>Lista de Figuras</b> .....	ix
<b>Lista de tablas</b> .....	xii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	4
2.1 Anatomía y fisiología del tracto gastrointestinal del pargo flamenco .....	4
2.1.1 Hábitos alimenticios de la especie .....	4
2.1.2 Organización del tracto gastrointestinal del pargo flamenco.....	4
2.1.3 Digestión y asimilación de nutrientes .....	5
2.2 Microbiota intestinal.....	7
2.2.1 Influencia de la dieta en la microbiota intestinal del hospedero .....	7
2.2.2 Enzimas de la microbiota encontrada en los peces.....	9
2.2.3 Métodos para el estudio de la microbiota intestinal .....	10
2.2.4. Estudios metagenómicos en peces .....	11
III. JUSTIFICACIÓN .....	12
IV. HIPÓTESIS .....	13
V. OBJETIVO GENERAL .....	14
5.1 Objetivos específicos.....	14
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
6.1 Área de estudio.....	15
6.2 Formulación de las dietas experimentales.....	15
6.3 Elaboración de las Dietas Experimentales .....	16
6.4 Descripción del sistema experimental .....	17
6.5 Recolecta de heces y raspado de órganos.....	19
6.5.1. Recolecta de heces .....	19
6.5.2. Raspado de órganos.....	20
6.6 Cuantificación de bacterias heterótrofas totales .....	22
6.7 Extracción de ADN para análisis de la microbiota .....	23

6.8	Concentración y pureza de ADN .....	24
6.9	Amplificación del gen 16S por PCR.....	24
6.10	Productos de amplificación 16s .....	25
6.11	Secuenciación masiva .....	26
6.12	Análisis bioinformático .....	26
6.12.1	Limpieza.....	27
6.12.2	Asignación de Otus.....	27
6.12.3	Rarefacción.....	28
6.12.4	Diversidad alfa.....	28
6.12.5	Diversidad beta .....	29
6.13	Análisis estadístico .....	30
VII.	RESULTADOS.....	31
7.1	Determinación de bacterias heterótrofas totales .....	31
7.1.1	Bacterias heterótrofas totales en agar marino .....	31
7.1.2	Bacterias heterótrofas totales en TSA adicionado con 2.5% de NaCl .....	32
7.2	Metagenómica .....	33
7.2.1	Secuenciación.....	33
7.2.2	Limpieza.....	34
7.2.3	Rarefacción.....	35
7.2.4	Asignación de OTUs .....	38
7.2.5.	Diversidad alfa de la microbiota residente .....	46
7.2.6.	Diversidad alfa de la microbiota transitoria .....	48
7.2.7.	Diversidad beta.....	49
7.2.8	Análisis estadístico de la estructura bacteriana .....	51
VIII.	DISCUSIONES .....	61
IX.	CONCLUSIONES .....	68
X.	RECOMENDACIONES .....	69
XI.	BIBLIOGRAFÍA .....	70
XII.	ANEXOS .....	78



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Sistema digestivo del pargo flamenco <i>L. guttatus</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Sistema experimental en el que se realizó el experimento.....	17
<b>Figura 3.</b> Diseño experimental, el pez color gris representa el pez marcado.....	18
<b>Figura 4.</b> Periodos de alimentación y toma de muestras.....	19
<b>Figura 5.</b> Recolección de heces de peces alimentados con dietas de diferente fuente de proteína, método de masaje abdominal.....	20
<b>Figura 6.</b> Raspado de ciego pilórico (izquierda) e intestino distal (derecha) para obtener una muestra de la microbiota residente de <i>L. guttatus</i> .....	20
<b>Figura 7.</b> Siembra en placa de muestras de la microbiota transitoria (heces) de pargo flamenco...	22
<b>Figura 8.</b> Conteo de UFC g <sup>-1</sup> de Bacterias Heterótrofas Totales en microbiota transitoria través del tiempo y de los diferentes tratamientos en agar marino.....	31
<b>Figura 9.</b> Conteo de UFC g <sup>-1</sup> de Bacterias Heterótrofas Totales en microbiota transitoria a través del tiempo y de los diferentes tratamientos en TSA adicionado con 2.5% de NaCl.....	32
<b>Figura 10.</b> Cargado de los chips Ion 316v2 con las muestras secuenciadas; se muestra el histograma de frecuencias de cada corrida, en el cual el eje de las abscisas indica la longitud de las lecturas y el eje de las ordenadas el número de secuencias obtenidas. ....	33
<b>Figura 11.</b> Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de raspados de ciegos pilóricos (CP).....	37
<b>Figura 12.</b> Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de raspados de intestino proximal (IP).....	37
<b>Figura 13.</b> Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de raspados de intestino distal (ID).....	37
<b>Figura 14.</b> Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de heces iniciales (HD 1). ....	37
<b>Figura 15.</b> Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de heces del día 10 (HD10). ....	37
<b>Figura 16.</b> Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de heces del día 20 (HD20). ....	37
<b>Figura 17.</b> Gráfica de proporción de secuencias asignadas como bacterias y no asignadas de las muestras de heces y raspados de órganos.....	39
<b>Figura 18.</b> Estructura de la microbiota residente a nivel phylum de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes dietas. AM= Dieta Animal Marino, AT= Dieta Animal Terrestre, VG= Dieta Vegetal.....	40
<b>Figura 19.</b> Estructura de la microbiota transitoria a nivel phylum de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes dietas. D1=Día 1, D10= Día 10, D20= Día 20. ....	40
<b>Figura 20.</b> Estructura de la microbiota residente a nivel clase de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes dietas. AM= Dieta Animal Marino, AT= Dieta Animal Terrestre, VG= Dieta Vegetal.....	41
<b>Figura 21.</b> Estructura de la microbiota transitoria a nivel clase de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes dietas. D1=Día 1, D10= Día 10, D20= Día 20. ....	41
<b>Figura 22.</b> Estructura de la microbiota residente a nivel orden de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes dietas. AM= Dieta Animal Marino, AT= Dieta Animal Terrestre, VG= Dieta Vegetal.....	41

	42
<b>Figura 23.</b> Estructura de la microbiota transitoria a nivel orden de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes dietas. D1=Día 1, D10= Día 10, D20= Día 20. . . . .	43
<b>Figura 24.</b> Estructura de la microbiota residente a nivel familia de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes dietas. AM= Dieta Animal Marino, AT= Dieta Animal Terrestre, VG= Dieta Vegetal. . . . .	44
<b>Figura 25.</b> Estructura de la microbiota transitoria a nivel familia de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes dietas. D1=Día 1, D10= Día 10, D20= Día 20. . . . .	44
<b>Figura 26.</b> Índices de diversidad de la microbiota residente presente en muestras de ciegos pilóricos, intestino proximal, intestino distal de <i>L. guttatus</i> alimentados con dietas con diferentes fuentes de proteína. . . . .	48
<b>Figura 27.</b> Índices de diversidad de muestras de heces (microbiota transitoria) de <i>L. guttatus</i> alimentados con dietas con diferente fuente de proteína. . . . .	48
<b>Figura 28.</b> Diversidad Beta de todas las muestras analizadas. . . . .	50
<b>Figura 29.</b> Distribución de las muestras en el Análisis de Componentes Principales a nivel familia de microbiota residente y transitoria de <i>L. guttatus</i> alimentado con diferentes fuentes de proteína en la dieta. . . . .	51
<b>Figura 30.</b> Gráficos de cajas y bigotes con análisis <i>a posteriori</i> en el que se representa el número de secuencias en la familia <i>Pseudomonadaceae</i> que presentó diferencias significativas en intestino distal de <i>L. guttatus</i> alimentado diferentes fuentes de proteína en la dieta. . . . .	52
<b>Figura 31.</b> Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis <i>a posteriori</i> en el que se representa el número de secuencias en la familia <i>Enterobacteriaceae</i> en las diferentes secciones del intestino y heces de <i>L. guttatus</i> alimentado con dieta AM. . . . .	53
<b>Figura 32.</b> Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis <i>a posteriori</i> en el que se representa el número de secuencias en la familia <i>Vibrionaceae</i> en las diferentes secciones del intestino y heces de <i>L. guttatus</i> alimentado con dieta AM. . . . .	54
<b>Figura 33.</b> Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis <i>a posteriori</i> en el que se representa el número de secuencias de <i>Gamaproteobacterias</i> en las diferentes secciones del intestino y heces de <i>L. guttatus</i> alimentado con dieta AM. . . . .	55
<b>Figura 34.</b> Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis <i>a posteriori</i> en el que se representa el número de secuencias en las familias que presentaron diferencias significativas en las diferentes secciones del intestino y heces de <i>L. guttatus</i> alimentado con dieta AT. . . . .	56
<b>Figura 35.</b> Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis <i>a posteriori</i> en el que se representa el número de secuencias de las familias <i>Burkholderiaceae</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> en las diferentes secciones del intestino y heces de <i>L. guttatus</i> alimentado con dieta VG. . . . .	57
<b>Figura 36.</b> Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis <i>a posteriori</i> en el que se representa el número de secuencias de las familias <i>Pseudomonadaceae</i> y <i>Vibrionaceae</i> en las diferentes secciones del intestino y heces de <i>L. guttatus</i> alimentado con dieta VG. . . . .	58
<b>Figura 37.</b> Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis <i>a posteriori</i> en el que se representa el número de secuencias de las Gammaproteobacterias en las diferentes secciones del intestino y heces de <i>L. guttatus</i> alimentado con dieta VG. . . . .	59
<b>Figura 38.</b> Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis <i>a posteriori</i> en el que se representa el número de secuencias en las familias que presentaron diferencias significativas en	

heces de *L. guttatus* alimentado al inicio con dieta AM (1), 10 días con dieta VG (10) y posteriormente 10 días con dieta AM nuevamente (20). .....

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición y análisis proximal de las dietas experimentales para pargo flamenco con inclusiones de diferentes fuentes de proteína.....	16
<b>Tabla 2.</b> Muestras de heces (microbiota transitoria) y raspados de órganos (microbiota residente) recolectadas en el transcurso del experimento.....	21
<b>Tabla 3.</b> Valores de secuenciación de todas las muestras separadas por chip de corrida. ....	34
<b>Tabla 4.</b> Pendientes promedio de las curvas de rarefacción por tipo de muestra.....	36
<b>Tabla 5.</b> Número de taxa identificados, secuencias asignadas, no asignadas, y no clasificadas con su respectivo número de secuencias de todas las muestras de pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> . ....	38
<b>Tabla 6.</b> OTUs encontradas en todas las muestras (microbioma núcleo).....	45

## RESUMEN

El pargo (*L. guttatus*) es una especie de interés comercial con avances tecnológicos importantes. Para su alimentación, se ha logrado la sustitución parcial de harina de pescado (HP) hasta de un 30% por harinas vegetales y con subproductos de rastro (harina de cerdo y/o ave) la sustitución total, sin cambios significativos en el crecimiento y la salud del pez. Sin embargo, el cambio de la dieta, podría repercutir en la composición de la comunidad bacteriana, que pudieran provocar una disbiosis en el tracto intestinal del organismo. Por lo que es recomendable una mayor investigación del efecto de la dieta en la microbiota intestinal de los peces. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de las dietas elaboradas con fuentes de proteína animal marino (AM), animal terrestre (AT) y vegetal (VG) en la microbiota intestinal residente y transitoria del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). Mediante el método de masaje abdominal se obtuvieron heces de peces (peso  $106.48 \pm 12.02$  g) al inicio que se habían alimentado con dieta a base de harina de pescado (AM). Se obtuvieron heces y raspado de ciegos pilóricos (CP), intestino proximal (IP) y distal (ID) 10d después de haber hecho cambio a las tres dietas con diferentes fuentes de proteína: Dieta AM, dieta VG y la dieta AT. Se obtuvieron heces nuevamente 10d después de haber alimentado con la dieta AM a los peces de todos los tratamientos. Se cuantificaron bacterias viables y se realizó análisis de aproximación metagenómica mediante la amplificación del gen 16S rRNA región V3. El seguimiento de los tratamientos fue individual a los mismos organismos a través del tiempo. Se analizaron diferencias significativas en conteo de bacterias viables mediante un Modelo Lineal General con prueba *a posteriori* SNK ( $P < 0.05$ ) y para el análisis de las secuencias obtenidas en proporciones mayores al 1% se utilizó el programa STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles). El phylum *Proteobacteria* fue el más abundante en todas las muestras y las mayores diferencias significativas las presentó la dieta VG.

**Palabras clave.** *Lutjanus guttatus*, microbiota intestinal, nutrición de peces.

## I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura, es el sector de producción de alimentos que está creciendo más rápido y de manera sostenida, representa la mitad del pescado destinado a la alimentación mundial (FAO, 2016). La acuicultura de especies de peces dulceacuícola es la que presenta un mayor desarrollo y son escasos los cultivos de especies de aguas marinas y salobres (Norzagaray *et al.*, 2012), es por ello que ha sido necesario la búsqueda de especies marinas que tengan el potencial de ser domesticadas y puedan servir de alimento que aporte proteína animal a la población mundial. El pargo flamenco (*Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869), es una especie viable técnicamente, ya que se conoce su biología, se ha logrado reproducir en cautiverio y desarrollado la producción de larvas en forma masiva (Ibarra-Castro *et al.*, 2011), las que posteriormente se han logrado engordar en jaulas hasta llegar a tallas comerciales a una densidad de 20 kg/m<sup>3</sup> en un experimento de 360 días de duración (Hernández *et al.*, 2015).

Debido a la tendencia actual en la reducción de las capturas de las especies de peces marinos (principalmente sardinas) que sostienen la producción de harina usada en la elaboración de alimentos balanceados, uno de los objetivos principales de la nutrición acuícola es reducir la dependencia de este tipo fuentes de proteína mediante su reemplazo con proteína de origen vegetal o de animales terrestres (Desai *et al.*, 2012; Oliva-Teles *et al.*, 2015). Sin embargo, uno de los inconvenientes de las harinas vegetales es que presentan un alto contenido de carbohidratos no almidonados, que son indigeribles por peces carnívoros, por lo que necesitan ser removidos o disminuidos de las dietas (Glencross, 2011). Por otro lado, las harinas elaboradas con sub-productos de rastro (cerdo y pollo) han probado ser fuentes de proteína convenientes para la alimentación de peces marinos carnívoros debido a que presentan valores de digestibilidad aparente superior al 84% y un adecuado perfil de aminoácidos (Hernández *et al.*, 2015). Esto ha permitido el reemplazo total de la harina de pescado por la de subproductos de rastro en dietas para juveniles de *L. guttatus* sin afectar el

crecimiento (Peña, 2016). Estudios recientes (Ringo *et al.*, 2006; De Paula-Silva *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2012; Gatesoupe *et al.*, 2013; Hartviksen *et al.*, 2014) han demostrado que la inclusión de diferentes fuentes de proteína y carbohidratos en la dieta provoca un cambio en la microbiota intestinal. Por lo que es posible que una dieta formulada con este tipo de ingredientes pudiera provocar un desequilibrio o disbiosis en la microbiota del hospedero. El balance de la microbiota es clave para mantener la salud en los peces (Gómez & Balcázar, 2008). En una disbiosis la población de bacterias patógenas crece a una tasa que supera la respuesta del sistema inmunitario y se impone a la microbiota normal o protectora (Balcazar *et al.*, 2006; Llewellyn *et al.*, 2014). A pesar que se han encontrado cambios significativos al sustituir proteína de pescado por proteína de soya en especies tales como salmón del atlántico (*Salmo salar*) y bacalao (*Gadus morhua*) (Ringo *et al.*, 2006; Hartviksen *et al.* 2014), no está claro si esos cambios pueden llamarse disbióticos, ya que se conoce poco sobre el estado “natural” de la microbiota intestinal en estas especies. Por lo tanto es importante incorporar este indicador de la salud del pez en los estudios que se realizan en la búsqueda de fuentes de proteínas alternativas para la acuicultura.

Es importante considerar que un prerrequisito al análisis de la influencia de la microbiota bacteriana en la digestión y asimilación de nutrientes una especie, es contar con el conocimiento morfofisiológico del sistema digestivo (anatomía gastrointestinal, producción y actividad enzimática, metabolismo del tracto digestivo del hospedero y caracterización de metabolitos). Lo anterior es fundamental para estudiar las relaciones de la digestión del hospedero con la microbiota y sus metabolitos (Clements *et al.*, 2014). Para el pargo flamenco se ha determinado el valor nutricional de una serie de ingredientes en la formulación de dietas artificiales, en términos de supervivencia, crecimiento, digestibilidad *in vivo* y eficiencia alimenticia (Hernández *et al.*, 2015). Así mismo, se ha descrito la morfología digestiva y la actividad enzimática en diferentes regiones de su sistema digestivo a diferentes edades y alimentados con diferentes dietas (Sánchez-Gutiérrez, 2013; Benítez, 2013; Sánchez-Rodríguez, 2013; Peña *et al.*, 2015).

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la dieta con ingredientes proteínicos de diferente origen sobre la microbiota intestinal del pargo flamenco, con base en la identificación de las comunidades bacterianas en ciegos pilóricos, intestino y heces mediante un estudio metagenómico dirigido al gen 16S rRNA, así como la cuantificación de bacterias heterótrofas totales.



## II. ANTECEDENTES

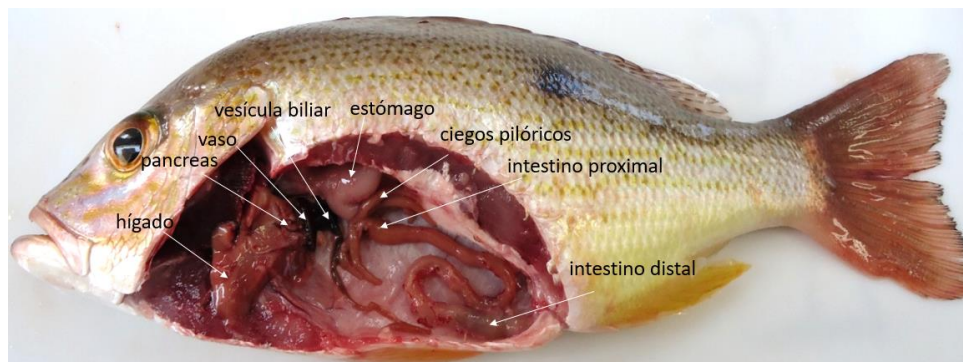
### 2.1 Anatomía y fisiología del tracto gastrointestinal del pargo flamenco

#### 2.1.1 Hábitos alimenticios de la especie

El pargo flamenco es carnívoro oportunista, depredador activo, se alimenta por la noche, amanecer y crepúsculo de pequeños peces, calamares y en ocasiones camarones y cangrejos (Boza-Abarca *et al.*, 2008). Es una especie que se adapta rápidamente a condiciones de cultivo en periodos cortos de tiempo (Alvarez-Lajonchere *et al.*, 2011).

#### 2.1.2 Organización del tracto gastrointestinal del pargo flamenco

En peces, las funciones digestivas del intestino y del estómago son similares a otros vertebrados. Estas funciones se centran en la degradación de macromoléculas presentes en los alimentos en pequeñas moléculas y elementos, que pueden ser absorbidas a través de la pared intestinal (Grosell *et al.*, 2011). La anatomía del sistema digestivo del pargo flamenco presenta el patrón típico de un pez carnívoro: se constituye por la región oro-faríngea que se conecta a un corto esófago, el cual desemboca en un estómago saciforme en forma de “Y”. El estómago se conecta a cinco ciegos pilóricos y por último se encuentra el intestino, que presenta una longitud aproximada del 50% de la longitud total del pez. Además, presenta glándulas accesorias a la digestión como lo son: el bazo, la vesícula biliar y el hígado (Hernández-Maldonado, 2013) (Figura 1).



**Figura 1.** Sistema digestivo del pargo flamenco *L. gutattus*. Modificado de Hernández-Maldonado (2013).

### 2.1.3 Digestión y asimilación de nutrientes

La digestión del alimento depende de tres factores principales: i) la cantidad del alimento ingerido y del grado al que es susceptible a la acción de las enzimas, (ii) la actividad de las enzimas digestivas y iii) el periodo de tiempo que es expuesto a la acción de las enzimas digestivas (Ray *et al.*, 2012). Para el pargo flamenco se han reportado tiempos de tránsito de alimento que van de 3 a 5 horas (Hernández *et al.*, 2015.). Los peces presentan enzimas digestivas tales como proteasas, carbohidrasas y lipasas, para digerir proteínas, carbohidratos y grasas respectivamente (Moyle & Coech, 2000). En los estudios sobre la actividad enzimática endógena que presenta el pargo flamenco se ha reportado que en esta especie cuando es alimentada con dietas con diferentes niveles de soya y suplementadas con taurina, se presenta alta actividad de lipasas en los ciegos pilóricos y en el intestino (Sánchez-Gutiérrez, 2013). Sánchez-Rodríguez (2013), determinó que el pargo flamenco presenta actividad enzimática endógena de tripsina y proteasas alcalinas en ciegos pilóricos e intestino completo, cuando se alimenta con dietas con diversas proporciones de una mezcla de krill y soya en sustitución de harina de pescado.

Benitez-Hernández (2013) encontró actividad enzimática endógena para la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa en el hepatopáncreas, en ciegos pilóricos, intestino anterior y posterior; también de la piruvato quinasa (PK) en el hepatopáncreas. Todas en pargo flamenco alimentado con dietas con diferentes niveles de

carbohidratos. Esto demostró la capacidad de la especie para digerir y asimilar hasta un 35% de carbohidratos en la dieta del pargo, sin afectar el crecimiento ni la salud del pez. Recientemente, Peña *et al.* (2015) determinaron la actividad endógena de las proteasas en el estómago, ciegos pilórico e intestino (dividido en proximal, medio y distal) en juveniles *L. guttatus* de tres, siete y doce meses después de eclosión, con pesos de  $21.3 \pm 2.6$  g,  $190 \pm 4.4$  g y  $400 \pm 11.5$  g respectivamente. Los autores reportan un incremento de la actividad de las proteasas con respecto a la edad de los peces.

Todos estos estudios se han enfocado en investigar aspectos convencionales de actividad enzimática propia de la especie en estudio. Sin embargo, la identificación de la actividad enzimática en el tubo digestivo suele ser cualitativa; sin embargo, puede haber confusiones atribuido al peristaltismo del hospedero, a las enzimas propias de las presas o a la actividad de la microbiota intestinal (Guillaume *et al.*, 2004; Ray *et al.*, Para entender la contribución endosimbiótica de la microbiota a la digestión, se requiere obtener mayor información sobre la importancia relativa de enzimas digestivas exógenas (producidas por la microbiota) y endógenas (producidas por el hospedero) (Clements *et al.*, 1997). Se han realizado algunos estudios sobre enzimas exógenas, y en peces tropicales se ha encontrado una microbiota activa en los ciegos pilóricos que sintetiza vitaminas; incluso en algunos otros casos, como en la chopo buffalo *Kyphosus cornelli*, se ha documentado la presencia de microbiota con actividad celulolítica (Guillaume *et al.*, 2004). Como se ha detallado anteriormente, se han estudiado los aspectos convencionales relacionados a la digestión y absorción de nutrientes en teleósteos; sin embargo, varios autores coinciden en que se requiere una mayor indagación del papel que juega la microbiota en la digestión y la asimilación de los nutrientes proporcionados a través de la dieta (Clements *et al.*, 2014; Ringo *et al.*, 2015).

## 2.2 Microbiota intestinal

La microbiota intestinal se clasifica en residente o transitoria. Cuando tiene la capacidad de colonizar la superficie intestinal del hospedero o se asocia a las microvellosidades, se le llama residente. La microbiota transitoria se asocia a la ingesta o se encuentra presente en el lumen (Ringo *et al.*, 2015)

### 2.2.1 Influencia de la dieta en la microbiota intestinal del hospedero

La dieta del hospedero tiene gran influencia sobre la composición de la microbiota bacteriana en su sistema digestivo. Varios autores coinciden en que la microbiota intestinal es parte importante de la degradación de nutrientes en el tracto digestivo y que se requiere de mayor indagación en esta línea de investigación, con el objetivo de mejorar la alimentación de los organismos cultivados (Gatesoupe *et al.*, 1997; Ringo *et al.*, 2006; Nicholson *et al.*, 2012; Clements *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014; Ringo *et al.*, 2015).

Llewellyn *et al.* (2014) exponen que la microbiota juega un papel crítico en las vidas de los hospederos vertebrados. En humanos y ratones está cada vez más claro que la inmunidad innata y adaptativa se desarrolla en estrecha relación con la microbiota comensal. Además, algunos aspectos de la digestión y metabolismo de los nutrientes son gobernados por la microbiota intestinal. Los probióticos son los microorganismos que colonizan el tracto digestivo y tienen efectos benéficos sobre los organismos. Estos surgen como una alternativa a los antibióticos y promotores de crecimiento. Entre los beneficios que los probióticos brindan se incluyen las mejoras en la digestión, inmunidad y resistencia a enfermedades (Escobar *et al.*, 2006).

En muchos estudios se menciona que la microbiota intestinal de los peces presenta diferencias que van de acuerdo a los hábitos alimenticios, y que al mismo tiempo, las poblaciones de bacterias pueden ser influenciadas por los ingredientes de la dieta y el medio que las rodea (Clements *et al.*, 2014; Llewellyn *et al.*, 2014).

Pedrotti *et al.* (2015) investigaron las poblaciones de bacterias presentes en el tracto intestinal de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y bagre sapo (*Rhamdia quelen*), ambas especies alimentadas con dietas en las que sustituyeron la dextrina por el bagazo de yuca, salvado de trigo, arroz o maíz molido. Sus resultados indicaron que el arroz molido incrementó los niveles de bacterias totales cultivables y que con el bagazo de yuca y maíz molido se elevaron significativamente las poblaciones de bacterias amilolíticas en tilapia. Los resultados eran esperados por tratarse de especies omnívoras; sin embargo, el estudio reveló que las dietas suministradas alteraron la composición de bacterias en el intestino de estos peces.

En el mismo contexto, se ha enfatizado que los microorganismos que mejoran la salud intestinal y el sistema inmune dominan las comunidades bacterianas del hospedero (Llewelyn *et al.*, 2014). Grandes esfuerzos se han realizado para encontrar los suplementos dietarios que aseguren una colonización intestinal con microorganismos benéficos para el desarrollo de los organismos (Rehulka *et al.*, 2014; Gatesoupe *et al.*, 2013; Jobling, 2015).

A pesar de que las especies carnívoras difieren en la presencia de microorganismos comparados con los herbívoros y los omnívoros, a continuación se mencionan algunos estudios que evalúan el cambio de la microbiota intestinal por el efecto de la sustitución de diferentes fuentes de proteína o carbohidratos en la dieta de peces con hábitos carnívoros.

Para el bacalao (*Gadus morhua*) alimentado con harina de pescado, harina de soya y harina de soya bioprocesada, se evaluaron las poblaciones de bacterias heterotróficas aerobias con la técnica de dilución en placa, se aislaron y se caracterizaron por propiedades bioquímicas y fenotípicas 944 aislados y 425 aislados se identificaron por secuenciación del gen 16S rRNA. La suplementación con proteína derivada de soya resultó en cambios significativos en la microbiota, incluida la presencia de bacterias atípicas del ambiente marino. El tracto intestinal de peces alimentados con harina de pescado lo dominaron las bacterias gram positivas del género *Brochotrix* y *Carnobacterium*, mientras que el tracto digestivo de peces alimentados con harina de soya dominaron las bacterias gram

negativas *Chryseobacterium spp.* y *Psychrobacter glacincola*, y *Carnobacterium* perteneciente a las bacterias gram positivas. El género *Psychrobacter* dominó en el tracto intestinal de peces alimentados con harina de soya bioprocesada (Ringo *et al.*, 2006).

De Paula Silva *et al.* (2011) estudiaron el efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado por la harinas de lupino y colza en la microbiota intestinal de dorada (*Sparus aurata*). La microbiota se caracterizó usando conteo y aislamiento en placa y también se extrajo DNA para llevar a cabo el método PCR-DGGE. Los resultados muestran que en 24 días existen diferencias significativas en la presencia de microorganismos en el intestino de la dorada alimentada con las dietas, encontrando mayor presencia de microorganismos en peces alimentados con la dieta vegetal y a su vez un mayor número de bacterias en el intestino respecto del estómago.

Gatesoupe *et al.* (2013) alimentaron a la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) con diferentes niveles de inclusión y diferentes fuentes de carbohidratos, a las muestras para microbiota se le hizo extracción de RNA y posteriormente RT-PCR-DGGE. Se encontraron diferencias significativas en la composición de la microbiota dependiendo del tipo de carbohidrato en la dieta. Así demostraron que la flexibilidad funcional de la microbiota juega un papel importante en la adaptabilidad digestiva del pez, de lo que infiere que las enzimas exógenas propias de la microbiota contribuyen la digestión de los nutrientes. Sin embargo, los autores consideran que es un tema que requiere mayor investigación para obtener resultados concluyentes.

### **2.2.2 Enzimas de la microbiota encontrada en los peces**

Se han hecho estudios experimentales sobre actividad enzimática y la posible contribución de la microbiota intestinal en la nutrición de los peces, los cuales sugieren que la microbiota intestinal podría estar causando efectos positivos en los procesos digestivos del pez. Se han aislado e identificado enzimas producidas por la microbiota; sin embargo, en los peces, al ser animales poiquilotermos en contraste a los animales endotérmicos (que mantienen su temperatura corporal

constante), es difícil concluir la contribución exacta de la microbiota intestinal, ya que se adaptan a la temperatura del medio que los rodea y aumenta la complejidad y la variabilidad ecológica del tracto digestivo de diferentes especies de peces. Además Ray *et al.* (2012) establece que la presencia de un estómago y ciegos pilóricos, aunados a la longitud relativa del intestino, también influyen en la composición de la comunidad microbiana.

### **2.2.3 Métodos para el estudio de la microbiota intestinal**

Habitualmente se ha estudiado la microbiota a través del cultivo de los microorganismos y su identificación mediante pruebas fenotípicas clásicas tales como la morfología, la fisiología y las pruebas bioquímicas (Delgado, 2005). Sin embargo, es aceptado que las técnicas convencionales basadas en los diferentes medios de cultivo consumen tiempo, carecen de exactitud y no representan correctamente la diversidad bacteriana presente en el intestino del pez (Asfie *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2010). Lo anterior es debido a que existen bacterias no cultivables que llegan a representar el 99% de las bacterias que se encuentran presentes (Handelsman *et al.*, 2007); además, en mamíferos se ha identificado que muchas de las bacterias del contenido fecal son anaerobias estrictas. Esto obliga a manejarlas bajo estrictas condiciones reductoras durante su cultivo. Por lo tanto, el uso de técnicas moleculares para estudiar la ecología microbiana permite eliminar estos problemas, ya que contribuyen a entender la estructura de las comunidades bacterianas e incluye a los organismos que no son cultivables (Escalante, 2008). No obstante, los métodos convencionales se pueden usar en combinación con el análisis de secuencias 16S rRNA para caracterizar e identificar el papel funcional de la microbiota intestinal (Ghosh *et al.*, 2010; Mondal *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2012).

#### 2.2.4. Estudios metagenómicos en peces

La documentación de la microbiota presente en individuos saludables es el primer paso para entender los impactos de su manipulación en sistemas de acuicultura. Con la finalidad de obtener información de la comunidad bacteriana “saludable” en peces, recientemente se caracterizó la microbiota de sangre, agallas y heces de *Lutjanus campechanus*. Se usó el método de pirosecuenciación 454 de Roche para identificar los taxa de bacterias dominantes. Los autores encontraron que las *Gammaproteobacterias* dominaron en todos los tipos de muestras, incluyendo el género *Pseudoalteromonas* y *Photobacterium* en heces. *Pseudomonas* en sangre y agallas, en las agallas también dominó el género *Vibrio*. Se observó alta variabilidad en la composición de la comunidad bacteriana entre individuos (Tarnecki *et al.* 2016).

Otro estudio evaluó por medio de metagenómica del gen 16S con PhyloChip el cambio de la microbiota en el pez sable *Anoplopoma fimbria*, los peces se alimentaron con dietas en las que se sustituyó el aceite de pescado por aceite de lino y maíz. Los autores reportaron que los peces alimentados con dieta con aceite de maíz presentaron menor diversidad que las otras dietas. Además, la microbiota intestinal del pez sable fue dominada por *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*; esto independientemente de la dieta suministrada (Rhodes *et al.*, 2016).



### III. JUSTIFICACIÓN

Existe información que demuestra la influencia de la microbiota en la digestión de los alimentos en los peces herbívoros y omnívoros y un efecto menor en los de hábitos carnívoros. Para el caso del pargo flamenco, es importante conocer qué tipo de microorganismos conforman la microbiota intestinal cuando es alimentado con dietas con proteína de origen marino, y compararla con la microbiota que se desarrolla cuando se alimenta con proteína vegetal y animal terrestre. Ambos ingredientes con significativo potencial para sustituir a la harina de pescado.

El conocimiento de la microbiota del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) que se presenta por el consumo de dietas con diferentes fuentes de proteína, constituye un punto de partida para que a corto plazo se inicie el desarrollo de alimentos funcionales en esta especie, que puedan contribuir a un mejor aprovechamiento de los nutrientes que conduzca a mejorar su crecimiento, eficiencia del alimento y supervivencia.

#### IV. HIPÓTESIS

La microbiota intestinal residente y transitoria del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) se verá afectada por el consumo de una dieta con proteína animal terrestre, al promover la proliferación de bacterias de tipo anaerobia putrefactiva, mientras que el consumo de una dieta con proteína vegetal resultará en la proliferación de bacterias de tipo anaerobia fermentativa. La dieta con proteína animal marino proveerá información que se aproxime a la microbiota normal de *L. guttatus* cultivado.

## V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las dietas elaboradas con fuentes de proteína animal marino, animal terrestre y vegetal en la microbiota intestinal residente y transitoria del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*).

### 5.1 Objetivos específicos

1. Cuantificar las bacterias heterótrofas totales presentes en la microbiota transitoria de las heces de pargo flamenco *L. guttatus* alimentado con diferentes fuentes de proteína.
2. Caracterizar y evaluar el cambio de la microbiota residente en los ciegos pilóricos y el intestino del pargo flamenco *L. guttatus* alimentado con diferentes fuentes de proteína.
3. Caracterizar y evaluar el cambio de la microbiota transitoria en las heces del pargo flamenco *L. guttatus* alimentado con diferentes fuentes de proteína.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Área de estudio

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

### 6.2 Formulación de las dietas experimentales

Se formularon y elaboraron tres dietas experimentales isoproteicas (45% de proteína cruda) e isolipídicas con valores de lípidos crudos entre 9 y 15% de acuerdo a los requerimientos reportados para pargo flamenco (Abdo de la Parra *et al.*, 2010). Una dieta control a base de harina de pescado (HP) como principal fuente de proteína (AM), una dieta a base de proteína animal terrestre (AT) (harina de ave y cerdo), y una dieta a base de proteína vegetal (VG) (concentrado de soya y gluten de maíz) (Tabla 1).

**Tabla 2.** Composición y análisis proximal de las dietas experimentales para pargo flamenco con inclusiones de diferentes fuentes de proteína.

<b>INGREDIENTES</b>	<b>AM (g Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>AT (g Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>VG (g Kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Harina de pescado<sup>a</sup></b>	487.8	-	-
<b>Harina de krill<sup>b</sup></b>	84.8	-	-
<b>Harina de calamar<sup>f</sup></b>	67.5	-	-
<b>Harina de ave<sup>c</sup></b>	-	350.0	-
<b>Harina de cerdo<sup>d</sup></b>	-	375.2	-
<b>Harina de gluten de maíz<sup>e</sup></b>	-	-	350.9
<b>Concentrado de soya<sup>e</sup></b>	-	-	310.0
<b>CaHPO<sub>4</sub></b>	-	-	2.0
<b>Almidón</b>	252.6	206.1	199.1
<b>Aceite hígado de bacalao<sup>e</sup></b>	49.0	10.4	79.7
<b>ANÁLISIS PROXIMAL</b>			
<b>Proteína cruda</b>	46.25 ± 0.88	45.21 ± 0.33	46.87.059
<b>Lípidos crudos</b>	10.25 ± 0.15	10.81 ± 0.27	10.86 ± 0.11
<b>Ceniza</b>	11.43 ± 0.06	12.25 ± 0.24	5.11 ± 0.09
<b>ELN</b>	32.06 ± 0.84	31.73 ± 0.35	37.15 ± 0.49
<b>Energía (kcal/g)</b>	10.86 ± 0.0	19.53 ± 0.36	21.39 ± 0.13

Lecitina de soya 15.0 gKg<sup>-1</sup>, Alginato 30.0 gKg<sup>-1</sup>, Premezcla de minerales 2.3 gKg<sup>-1</sup>, Premezcla vitamínica 6.0 gKg<sup>-1</sup>, Carotenoides 1.0 gKg<sup>-1</sup>, Vit. C. 1.0 gKg<sup>-1</sup>, Colina 2.0 gKg<sup>-1</sup>; Antioxidante 0.1 gKg<sup>-1</sup>. **ELN**: Extracto libre de nitrógeno, **AM**: Dieta animal marina, **AT**: Dieta animal terrestre, **VG**: Dieta vegetal

<sup>a</sup>Harina de pescado grado premium obtenida de Selecta de Guaymas, <sup>b</sup>PROAQUA, S.A. DE C.V. Mazatlán, Sinaloa, México, <sup>c</sup>Harina de pollo grado mascota obtenida de Momentum Feed & Energy, LLC, <sup>d</sup>Proteínas marinas y agropecuarias S.A. de C.V. Guadalajara, Jalisco, <sup>e</sup>Droguería Cospomolita, S.A. de C.V. México, D.F., México. <sup>f</sup>Elaborada de manto de calamar gigante en la planta de alimentos (fileteado, secado y pulverizado).

### 6.3 Elaboración de las Dietas Experimentales

Se elaboraron las dietas experimentales siguiendo el protocolo de la Planta de Alimentos del CIAD, Unidad Mazatlán (Hernández *et al.*, 2010) (Anexo 1). Para la elaboración de las dietas se usó un pulverizador marca Micrón, una balanza Mettler PM 4800-Delta Ranger, una báscula marca TORREY EQB 50/100 50kg, una mezcladora y molino marca Hobart AT-200, y un secador de aire forzado.

Después de que los pellets se secaron, se cortaron del tamaño apropiado a la boca de los peces y se colocaron en bolsa de plástico con cierre hermético, previamente etiquetadas. Se almacenaron en un cuarto frío a una temperatura de 4°C para su conservación hasta su uso.

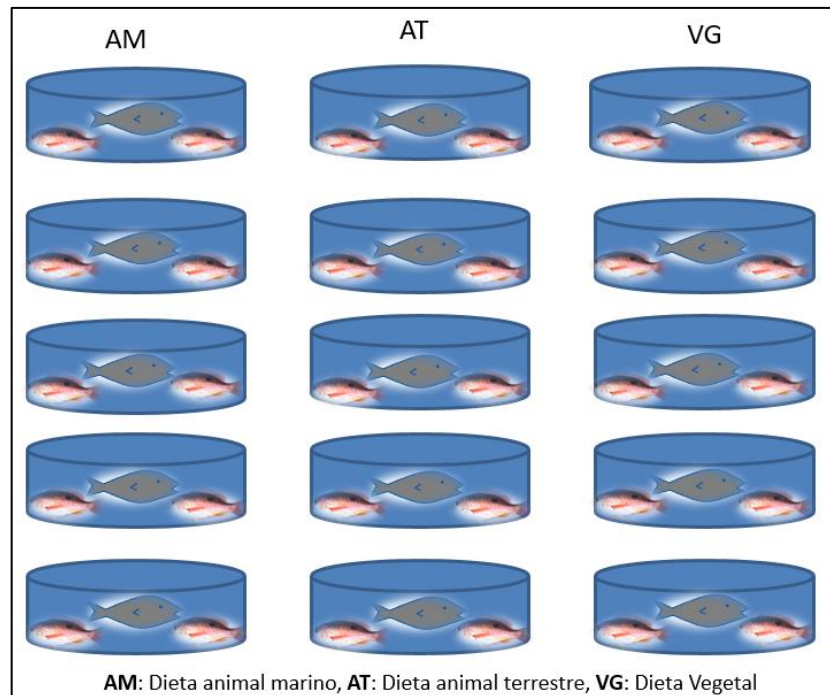
#### 6.4 Descripción del sistema experimental

El experimento se llevó a cabo en 15 tanques de fibra de vidrio color negro y fondo blanco, con capacidad de 300 litros cada uno, con drenaje central de 50mm cubiertos con malla sombra de 0.5 cm para evitar la salida del pez y a la vez permitir la limpieza de los tanques. Cada tanque estaba equipado con aireación y flujo de agua filtrada continuo abierto equivalente a 5 L min.<sup>-1</sup> (Figura 2).



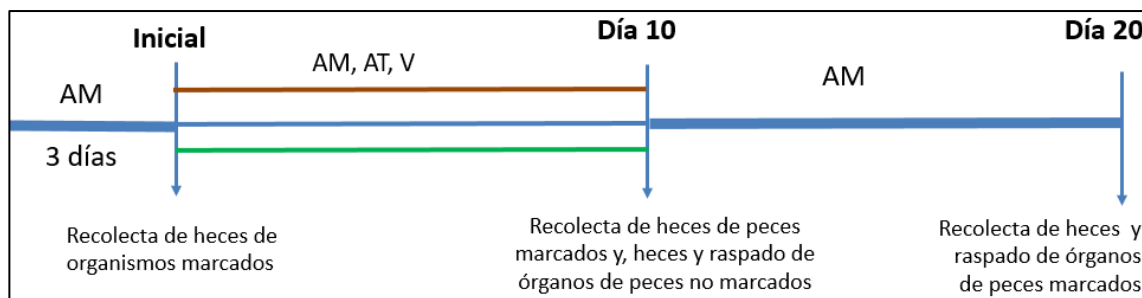
**Figura 2.** Sistema experimental en el que se realizó el experimento

Se colocaron 3 peces por tanque con peso promedio de  $106 \pm 12$  g, de los cuales sólo un pez fue marcado. El marcado se realizó haciendo un corte transversal en el lóbulo posterior de la aleta dorsal. Los tratamientos se distribuyeron de manera aleatoria, mediante sorteo sin reemplazo y se marcaron los tanques para su identificación (Figura 3). Una vez colocados los peces en sus respectivos tanques, se alimentó a todos los peces con dieta AM por un periodo de tres días, para su acondicionamiento alimentario. Cada tratamiento se llevó a cabo por quintuplicado y se mantuvo con la alimentación de diferentes dietas durante diez días, posteriormente se alimentó nuevamente a todos los peces con dieta AM (Figura 4), con la finalidad de evaluar si la microbiota se reestablece a su estado original.



**Figura 3.** Diseño experimental, el pez color gris representa el pez marcado.

La alimentación diaria se ofreció en cinco raciones al día (8:30, 9:30, 10:30, 11:30 y 16:00 horas).



**Figura 4.** Periodos de alimentación y toma de muestras

Durante el experimento se registró una temperatura de  $26.7 \pm 0.7$  °C y una concentración de oxígeno disuelto  $6.8 \pm 0.2$  mg/l. El fotoperiodo del experimento fue de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

## 6.5 Recolecta de heces y raspado de órganos

### 6.5.1. Recolecta de heces

Tres horas y media después de su primera ración, los peces se anestesiaron con esencia de clavo a concentración de  $0.25 \text{ mL L}^{-1}$ . Posteriormente se recolectaron las heces, bajo condiciones asépticas, mediante masaje abdominal (Austreng, 1978). Cada muestra de aproximadamente  $0.00971 \pm 0.00369$  g de heces se depositó en un tubo Eppendorf con 500  $\mu\text{l}$  de solución salina estéril. Después se maceró la muestra y se tomaron 100  $\mu\text{l}$  para realizar diluciones seriales y llevar a cabo la siembra en placas. Los 400  $\mu\text{l}$  restantes se depositaron en un tubo Falcon estéril con 3.6 ml de etanol al 96% y se conservaron a  $-4$  °C para su posterior análisis metagenómico (Figura 5).

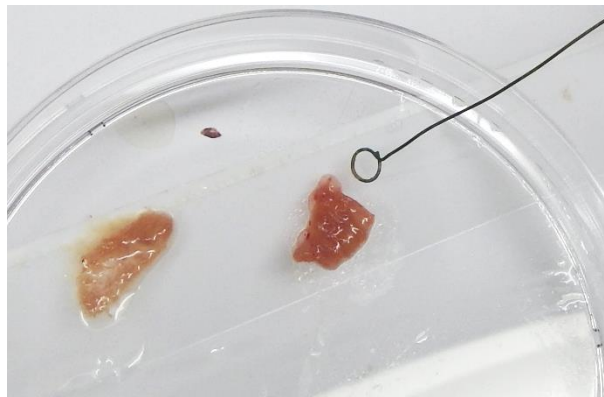




**Figura 5.** Recolección de heces de peces alimentados con dietas de diferente fuente de proteína, método de masaje abdominal.

### 6.5.2. Raspado de órganos

Para obtener las muestras requeridas para evaluar la microbiota residente, se disectó el pez, se tomó el órgano (ciego pilórico, intestino proximal o distal), se lavó con agua salina estéril y se hizo un raspado con una asa estéril. La muestra obtenida se depositó en un tubo Eppendorf con 1 ml de etanol al 96% y se conservaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis metagenómico (Figura 6).



**Figura 6.** Raspado de ciego pilórico (izquierda) e intestino distal (derecha) para obtener una muestra de la microbiota residente de *L. guttatus*.

En la Tabla 2 se presentan las muestras que se obtuvieron en cada uno de los muestreos.

**Tabla 2.** Muestras de heces (microbiota transitoria) y raspados de órganos (microbiota residente) recolectadas en el transcurso del experimento

DIETA	TANQUE	INICIAL (D1) HECES	D10 HECES	D20 HECES	D10 (CP, IP, ID) peces acomp.	D10 HECEs acomp.	D20 (CP, IP, ID) peces marcados
AM	3	si	Si	si	N/A	N/A	si
AM	7	si	Si	si	N/A	N/A	si
AM	10	si	no	no	si	si	no
AM	11	si	si	si	si	si	no
AM	13	si	si	si	si	si	si
AT	1	si	si	si	si	si	si
AT	6	si	si	si	si	si	si
AT	9	si	no	no	N/A	N/A	no
AT	12	si	si	si	si	si	si
AT	15	si	si	si	N/A	N/A	no
VG	2	si	si	si	si	no	si
VG	4	si	si	si	N/A	N/A	no
VG	5	si	si	si	si	si	si
VG	8	si	si	si	N/A	N/A	no
VG	14	si	si	si	si	no	si
	Total	15	13	13	27	7	27

D1: muestras iniciales, D10: día 10, D20: día 20. Peces acomp.: peces acompañantes. CP= ciegos pilóricos, IP= intestino proximal, ID= intestino distal. AM = dieta animal marino, AT= dieta animal terrestre, VG= dieta vegetal.

Todas las muestras de heces iniciales (D1) se procesaron para análisis bacteriológico, para el día 10 y 20 se eligieron tres muestras por tratamiento para. De la misma muestra se obtuvo 100 µL para siembra en placa y los 400 µL restantes se preservaron para análisis metagenómico. Para la dieta AM se eligieron las muestras de los tanques 3, 7 y 11; para la dieta animal terrestre se eligieron las muestras de los tanques 1, 6 y 12; y para la dieta vegetal las muestras de los tanques 2, 5 y 14. De los mismos tanques y organismos que se obtuvieron las heces también se obtuvo el raspado de los órganos, estas muestras solo se procesaron con metagenómica. De los mismos tanques que se analizaron las muestras de peces marcados el día 10 se obtuvieron las muestras de peces acompañantes.

Los tanques de los que no se obtuvo muestra el día 10 y 20 fue debido a que los peces marcados de esos tanques murieron antes del muestreo debido a las lesiones por el masaje abdominal.

#### 6.6 Cuantificación de bacterias heterótrofas totales

Para obtener las bacterias heterótrofas totales (BHT) se usó agar marino y agar Soya Trypticaseína (TSA) con adición de 2.5% de NaCl. Se tomaron tres muestras de heces por tratamiento. Se realizaron las diluciones decimales correspondientes y se sembró en placa 0.1 mL de muestra de dos diluciones seriales (Figura 7). Posteriormente, se incubó por 24 horas a 30°C y después se realizó el conteo de colonias viables (Camacho *et al.*, 2009; Reddy *et al.*, 2009).



**Figura 7.** Siembra en placa de muestras de la microbiota transitoria (heces) de pargo flamenco.

Una vez realizado el conteo en placa, se tomaron los valores entre 30 y 300 UFC y se empleó la fórmula para hacer la estimación de UFC g<sup>-1</sup>:

$$\text{UFC g}^{-1} = (\text{No. de colonias} * \text{factor de dilución})/\text{gramos de muestra}$$

## 6.7 Extracción de ADN para análisis de la microbiota

La extracción del ADN genómico (ADNg) bacteriano de las heces de *L. gutattus*, se obtuvo a partir del método de buffer CTAB:

1. Se centrifugaron los 4 ml de cada tubo Falcon por 5 minutos a temperatura ambiente y máxima velocidad, para concentrar la muestra.
2. Se colocaron las muestras en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL.
3. Se agregó 480  $\mu$ L de EDTA 0.5 M, 120  $\mu$ L de lizosima.
4. Se incubó a 37°C por 30 minutos, se centrifugó 2 minutos a velocidad máxima y, se tiró el sobrenadante.
5. Se agregó 350  $\mu$ L de buffer CTAB a cada tubo.
6. Se agregó 20  $\mu$ L de proteinasa K en una concentración de 20 mg/mL y agitar brevemente.
7. Se colocaron los tubos en un rotador a 55°C toda la noche o hasta que el tejido este lo suficientemente digerido.
8. Se agregó 300  $\mu$ L de LiCl 5M y se agitó por un minuto; posteriormente se agregó 600  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitó brevemente.
9. Se agitó la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente.
10. Se extrajo 500  $\mu$ L de la capa acuosa (parte superior) del centrifugado y transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL.
11. Se añadió 50  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 1 mL de Etanol al 100% frío; se agitó y colocó a -20°C durante toda la noche.
12. Se centrifugó durante 20 min a 13,000 rpm a 4°C y retiró el sobrenadante cuidadosamente para no perder el pellet de ADN sedimentado.
13. Se agregó 750  $\mu$ L de etanol al 70%, después, se agitó por 15 min a temperatura ambiente, enseguida se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante por decantación.

14. Se secó el pellet de ADN en una campana de flujo laminar, una vez secado, se añadió 50  $\mu\text{L}$  de agua de 18 $\Omega$  estéril para re suspender el pellet a 4°C durante toda la noche.
15. Se mezcló la muestra para asegurar que el pellet esté totalmente disuelto, y se calentaron los tubos a 95°C por 5 minutos e inmediatamente después se colocaron en hielo;
16. Se guardaron las muestras procesadas a -20°C.
17. Se estimó la calidad y cantidad de ADN en un mini gel de agarosa al 1% (3 $\mu\text{L}$  de ADN y 2 $\mu\text{L}$  de buffer de carga) por 30 minutos a 85 volts.

### 6.8 Concentración y pureza de ADN

Para determinar la concentración y pureza del ADN se usó el espectrofotómetro DeNovix DS-11, donde se colocó 1  $\mu\text{L}$  de la muestra en el orificio lector y se registró tanto la relación 260/280 nm de absorbancia que representa la pureza así como la concentración. Posteriormente la concentración de ADN se ajustó a 100 ng /mL<sup>-1</sup>.

### 6.9 Amplificación del gen 16S por PCR

Una vez que el ADN se ajustó, se amplificó por PCR una región de  $\approx 200$  pb correspondiente a la región V3 del gen 16S rRNA. Para esto se utilizó un primer marcado con una secuencia distinta (barcode) en cada muestra (Anexo 2), con la finalidad de organizar las secuencias correspondientes a su muestra.

El protocolo de PCR para la amplificación fue el siguiente: se estableció la etapa inicial (desnaturalización) en 95°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación donde se intercalaron 3 temperaturas (unión, alineación y extensión) en 3 periodos de tiempo (95°C/35 s, 56°C/35 s, y 72°C/1:30 min),

además de la extensión final a 72°C/10 min. Todas las reacciones de amplificación de PCR se realizaron en el instrumento BIO-RAD MyCycler™ Thermal Cycler.

Para la preparación de la mezcla maestra se utilizó la GoTaq® Flexi DNA Polimerasa de Promega. Cada reacción (muestra) fue de 12 µL más 0.5 µL de DNA (en total 12.5 µL de rx. por tubo). Por cada mezcla maestra se incluyó un control positivo y un control negativo el cual no lleva DNA. Para verificar que solo exista un amplicón se corrió un gel de agarosa al 2% a 90 V durante 30 minutos.

#### 6.10 Productos de amplificación 16s

Una vez obtenidos los productos de PCR se realizó la purificación utilizando el kit AxygenPrep-PCR® column.

1. A 20 µL de la reacción se adicionó 100 µL de Buffer PCR-A 3X y se agitó en vortex.
2. Se transfirió la mezcla a la columna de PCR en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 15000 G por 5 min.
3. Se regresó la columna del PCR al tubo.
4. Se añadió 700 µL de Buffer W2 en la columna y se centrifugó a 15000 G por 7 min.
5. Se filtró y se regresó la columna al tubo.
6. Se adicionó 400 µL del Buffer W2 y se centrifugó a 15000 G por 5 min.
7. Se filtró y centrifugó a 15000 G por 3min.
8. Se dejó secar la columna en la campana de flujo laminar durante 30 min.
9. Una vez secas las columnas se adicionó 20 µL de agua libre de nucleasas o agua de 18 Ω estéril.
10. Se incubó durante 1 min y se centrifugó a 12000 G por 3 min.
11. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

Al finalizar el procedimiento se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 90 V por 60 min para verificar el resultado. Se cuantificó el ADN utilizando el Qubit® dsDNA HS Assay Kit y se realizó una mezcla equimolar para cada muestra.

### 6.11 Secuenciación masiva

Primeramente se preparó el templado en el equipo Ion OneTouch (1T) system. Las muestras se encontraban a una misma concentración equimolar. Este paso previo a la secuenciación inmoviliza los fragmentos a secuenciar sobre un sustrato específico (ISP's), que permite su amplificación clonal (ePCR) y su posterior enriquecimiento. El enriquecimiento se hizo en el equipo Ion One Touch ES que separa las esferas positivas de las totales. Se lavó el secuenciador de acuerdo a las especificaciones del fabricante, se cargó el templado en el chip 318 y se secuenció.

### 6.12 Análisis bioinformático

Una vez obtenidos los archivos en formato FASTQ, se eliminaron las secuencias con una calidad inferior a Q20. Se eliminaron las secuencias cortas (inferiores a 100), los primers (fwd 338f y rvs 533r) y las secuencias inferiores a 130pb. Se recortaron las secuencias a no más de 180pb (del extremo 3'). Se convirtió de formato fastq a fasta. Posteriormente, se eliminaron las secuencias contaminantes que pueden ser quimeras o secuencias eucariontes. Por último se renombró cada una de las lecturas con el código para la muestra y un número consecutivo.

Para la comparación de comunidades microbianas se utilizó el programa QIIME (Quantitative Insights Into MicrobialEcology), que opera con base en datos de secuenciación de alto rendimiento generados en distintas plataformas

(<http://qiime.org/>). Con este se obtuvo las OTUs, la asignación taxonómica correspondiente y los índices de diversidad; a través de una serie de comandos ya establecidos en la terminal.

Estos pasos del análisis bioinformático se llevaron a cabo en la distribución MGlinux ver 1.4 del sistema operativo Linux. Para ejecutar MGlinux fue necesario instalar el programa de virtualización VirtualBox.

### **6.12.1 Limpieza**

Previo al análisis de secuencias mediante el programa QIIME, se realizó el proceso de limpieza y descontaminación de todas las muestras (quimeras y eucariotas), se usó el script \$ mg\_cleaner implementado en el servidor biobacter del CIAD Mazatlán, el cual procesó todos los archivos tipos fastq en un directorio y generó un solo archivo con todas las muestras ya limpias y libres de contaminantes.

### **6.12.2 Asignación de Otus**

Después de obtener las secuencias limpias, libres de contaminantes y concatenadas en un solo archivo se procedió a realizar el análisis de las secuencias por medio de QIIME 1.9.0. Se utilizaron un total de 2'408,652 para realizar el flujo bioinformático el cual incluye la obtención de las unidades taxonómicas operacionales (OTU por sus siglas en inglés), la obtención del microbioma núcleo (coreo otus) que son las OTUs encontradas en todas las muestras, obtención de diversidad alfa y beta, así como las curvas de rarefacción. En total se asignaron 16,130 OTUs para todas las secuencias, y se clasificaron en los distintos niveles taxonómicos (Dominio, phylum, clase, orden, familia, género y especie). La clasificación de las lecturas en OTUs se llevó a cabo con el método uclust y se comparó con la base de datos Greengenes.



### 6.12.3 Rarefacción

Las curvas de rarefacción se usan para saber si el número de secuencias obtenidas representan una fracción significativa o no de una muestra, permiten comparar la diversidad entre diferentes muestras y extrapolar la diversidad calculando el número hipotético de especies presentes en una muestra a través de estimadores de riqueza como Chao-1. El eje de las abscisas (X) representa el número de secuencias obtenidas de la muestra, y el eje de ordenadas (Y) el número de secuencias distintas del gen analizado (OTUs), con las especies observadas se obtuvieron las curvas de rarefacción que muestran el número de especies encontradas (OTUs) con respecto a la unidad muestral (secuencias) (Figuras 11 a la 16). Mientras mayor es la profundidad de muestreo, mayor será el número de especies colectadas, lo que provoca una mayor pendiente en la curva, a medida que se continua muestreando el número de nuevas especies deja de incrementar, lo que provoca una pendiente menor (Navarro, 2015), 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).

### 6.12.4 Diversidad alfa.

Para medir la diversidad alfa lo más conveniente es presentar valores tanto de riqueza como de algún índice de la estructura de la comunidad, de tal forma que ambos parámetros sean complementarios en la descripción de la diversidad bacteriana (Moreno, 2001). QIIME calcula de manera determinada tres métricas de diversidad: para riqueza otus observadas y para estructura *Chao1* y la diversidad filogenética (PD\_whole\_tree), además en el archivo alpha\_params.txt se agregaron a la lista de medidas de alfa diversidad los índices Simpson para dominancia y Shannon-Wiener para equidad.

*Chao 1*: es un estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra (Moreno, 2001).

$$Chao\ 1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

*Índice Simpson:* Manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Está fuertemente influido por la importancia de las especies más dominantes. Como su valor es inverso a la equidad, la diversidad puede calcularse como  $1 - \lambda$  (Moreno, 2001).

$$\lambda = \sum p_i^2$$

*Índice Shannon:* Expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección. Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y el logaritmo de S, cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos. Este índice contempla la cantidad de OTUs presentes en la muestra (riqueza) y la cantidad relativa de secuencias de cada una de esas OTUs (abundancia) (Moreno, 2001).

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

#### **6.12.5 Diversidad beta**

Con la tabla de OTUs generada en los pasos anteriores, la cual contenía el número de secuencias observada en cada OTU, el script `$ beta_diversity.py` generó una carpeta con archivos de texto con matrices de distancia, ponderadas (cuantitativas) y no ponderadas (cualitativas), entre muestras. Estas corresponden a la tabla de OTUs que se utilizó como archivo de entrada.

### 6.13 Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas de la microbiota tanto transitoria como residente entre las diferentes dietas, se usó el programa STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles), el cual realiza pruebas de normalidad y homocedasticidad a la tabla OTUs obtenida del análisis bioinformático de acuerdo a su clasificación taxonómica con un nivel de significancia del 95%.

Para obtener las diferencias estadísticas de la estructura bacteriana se utilizó el programa STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles por sus siglas en inglés) y solo se tomaron en cuenta aquellos taxa en los que la diferencia en las proporciones medias de las secuencias supera el 1%.

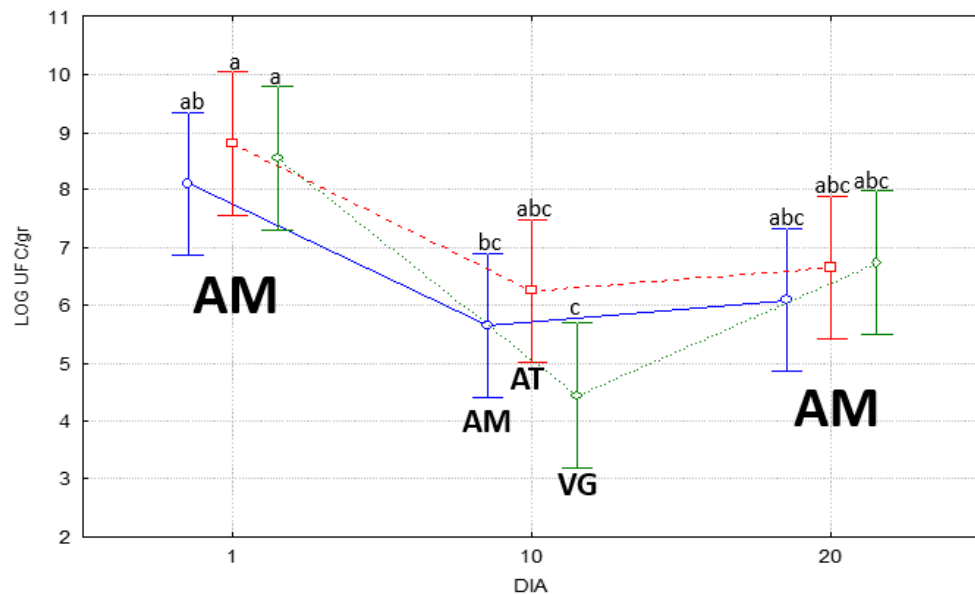
Cada grupo de muestras se realizó por separado para evitar sesgos ocasionados por las diferencias de comunidades bacterianas que existen entre el tipo de muestra (heces, ciegos pilóricos, intestino proximal, intestino distal) así como el tipo de dietas que se evaluaron en este estudio. Para justificar esta separación se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) a todas las muestras. Los datos del conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) en placa se sometieron a una prueba de homogeneidad de varianzas y de normalidad. Debido a que los datos resultaron no normales se analizaron con un Modelo Linear General (GLM) y se contrastaron las diferencias entre las medias con la prueba Student-Newman-Keuls (SNK) (Zar, 1999).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Determinación de bacterias heterótrofas totales

#### 7.1.1 Bacterias heterótrofas totales en agar marino

El conteo de UFC  $g^{-1}$  en heces sembradas en agar marino, de todos los grupos de peces alimentados inicialmente (día 1) con la dieta AM no presentaron diferencias significativas con valor de  $8.48 \pm 1.11 \log \text{UFC } g^{-1}$ . Sin embargo, en el día 10, las heces de los peces alimentados con la dieta VG muestran diferencias significativamente menor  $4.44 \pm 1.87 \log \text{UFC } g^{-1}$  con respecto al conteo de UFC  $g^{-1}$  del inicio (día 1)  $8.54 \pm 1.21$  y una tendencia a incrementar al día 20 de todos los tratamientos sin presentar diferencias significativas con respecto al inicio y al día 10, con valores de  $6.10 \pm 0.15 \log \text{UFC } g^{-1}$ ,  $6.66 \pm 0.98 \log \text{UFC } g^{-1}$ ,  $6.74 \pm 0.10 \log \text{UFC } g^{-1}$  para las dietas AM, AT y VG respectivamente (Figura 8).

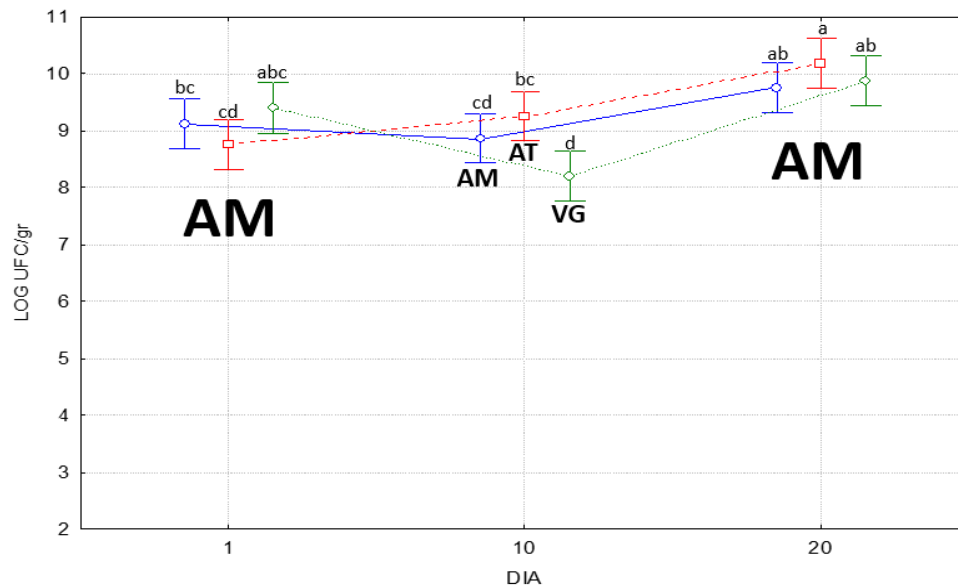


AM: Dieta control, AT: Dieta animal terrestre, VG: Dieta Vegetal

**Figura 8.** Conteo de UFC  $g^{-1}$  de Bacterias Heterótrofas Totales en microbiota transitoria través del tiempo y de los diferentes tratamientos en agar marino

### 7.1.2 Bacterias heterótrofas totales en TSA adicionado con 2.5% de NaCl

Se realizó el conteo en placa de las UFC de cada una de las muestras de los diferentes tratamientos sembrados en TSA adicionado con 2.5% de NaCl; al igual que en el agar marino, se observa que en el tiempo inicial (día 1) no se presentan diferencias significativas, ya que todos los peces se alimentaron con la misma dieta AM  $8.40 \pm 1.1 \log \text{ UFC g}^{-1}$ . En el día 10, las heces de los peces alimentados con la dieta VG muestra diferencia significativamente menor  $8.21 \pm 1.21 \log \text{ UFC g}^{-1}$  con respecto al conteo de UFC  $\text{g}^{-1}$  inicial (día 1)  $8.5 \pm 1.05 \log \text{ UFC g}^{-1}$  y al día 20  $9.88 \pm 0.21 \log \text{ UFC g}^{-1}$ . Las heces de los peces alimentados con dieta AT presentan diferencias significativas el día 20 ( $9.29 \pm 1.65 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ) con respecto al conteo inicial ( $8.75 \pm 1.40 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ) y al muestreo del día 10 ( $9.26 \pm 0.77 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ). En agar TSA adicionado con NaCl los conteos de UFC  $\text{g}^{-1}$  tienen una tendencia a incrementar en el día 20, mostrando los promedios más altos con valores de  $9.77 \pm 0.18 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ,  $9.29 \pm 1,65 \log \text{ UFC g}^{-1}$  y  $9.88 \pm 0.21 \log \text{ UFC g}^{-1}$  para las dietas AM, AT y VG respectivamente. Otra consideración en este tipo de agar es que la variabilidad se reduce (Figura 9).



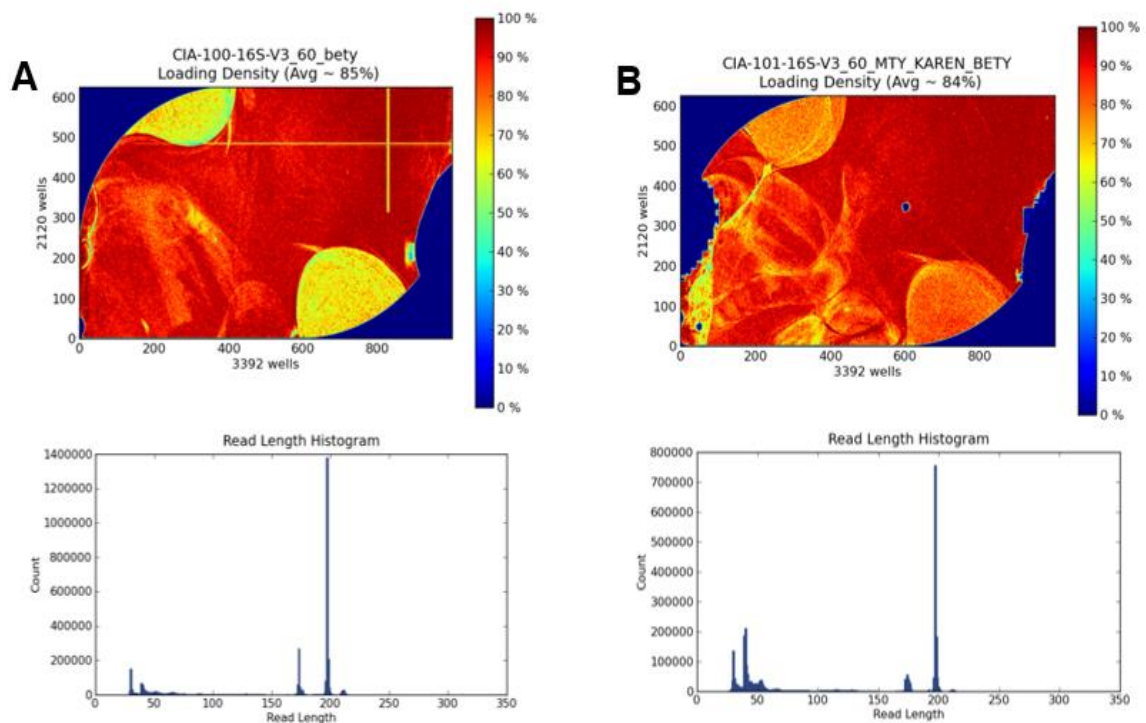
AM: Dieta control, AT: Dieta animal terrestre, VG: Dieta Vegetal

**Figura 9.** Conteo de UFC  $\text{g}^{-1}$  de Bacterias Heterótrofas Totales en microbiota transitoria a través del tiempo y de los diferentes tratamientos en TSA adicionado con 2.5% de NaCl

## 7.2 Metagenómica

### 7.2.1 Secuenciación

Debido a la capacidad que se tiene en el laboratorio, para las muestras que se tenían se necesitaba un chip completo y una parte de otro, por lo tanto se optó en correr las muestras faltantes en otro chip que tenía espacio disponible. Se realizaron dos pooles homogéneos. Se cargaron 49 y 41 muestras, en el chip A y B respectivamente, las muestras del chip A fueron todas de este experimento y 11 en el chip B. La secuenciación de las muestras seleccionadas se llevó a cabo en dos chips 316v2 con un cargado de 85% (A) y 84% (B), la moda del tamaño de lecturas 196 pb en ambos (Figura 10). Un buen cargado del chip indica una secuenciación de alta calidad y con una mayor cantidad de lecturas (Navarro, 2015).



**Figura 10.** Cargado de los chips Ion 316v2 con las muestras secuenciadas; se muestra el histograma de frecuencias de cada corrida, en el cual el eje de las abscisas indica la longitud de las lecturas y el eje de las ordenadas el número de secuencias obtenidas.

**Tabla 3.** Valores de secuenciación de todas las muestras separadas por chip de corrida.

	<i>Chip a</i>		<i>Chip b</i>	
<i>Celdas del chip</i>	6,337,389		6,337,389	
<i>Celdas con ISPs</i>	5,401,828	85.2%	5,308,166	83.8%
<i>ISPs vivas</i>	5,399,853	100%	5,304,876	99.9%
<i>ISPs control</i>	36,416	00.7%	28,674	00.5%
<i>Librería</i>	5,363,437	99.3%	5,276,202	99.5%
<i>Policlonales</i>	1,594,989	29.7%	1,964,719	37.2%
<i>Baja Calidad</i>	90,563	01.7%	114,447	02.2%
<i>Dímeros</i>	79	00.0%	251	00.0%
<i>Secuencias obtenidas</i>	3,677,806	68.6%	3,196,785	60.6%

### 7.2.2 Limpieza

Se eliminó el 14.98% de las secuencias totales obtenidas, con un promedio de 40,144 (3,430 - 142,794) secuencias útiles. La muestra ID5VG presentó el mayor porcentaje de secuencias eliminadas en la limpieza con un 70.44% y el menor porcentaje lo presentó la muestra H12D20AT con 0.56%. El mayor número de secuencias útiles se obtuvo de la muestra CP2VG con 142,794 y el mínimo HA5VG con 3,430.

Seqs Limpias	Total Quimeras	Total Eucariotas	Seqs Fasta (útiles)	% Eliminadas
2'832,884	61731	362501	2'408,652	14.98

Se eliminó el 14.98% de las secuencias totales obtenidas, con un promedio de 40,144 (3,430 - 142,794) secuencias útiles

### 7.2.3 Rarefacción

El eje de las abscisas (X) representa el número de secuencias obtenidas de la muestra, y el eje de ordenadas (Y) el número de secuencias distintas del gen analizado (OTUs), con las especies observadas se obtuvieron las curvas de rarefacción que muestran el número de especies encontradas (OTUs) con respecto a la unidad muestral (secuencias) (Acinas, 2007) (Figuras 11 a la 16). Mientras mayor es la profundidad de muestreo, mayor será el número de especies colectadas, lo que provoca una mayor pendiente en la curva, a medida que se continua muestreando el número de nuevas especies deja de incrementar, lo que provoca una pendiente menor (Navarro, 2015), 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).

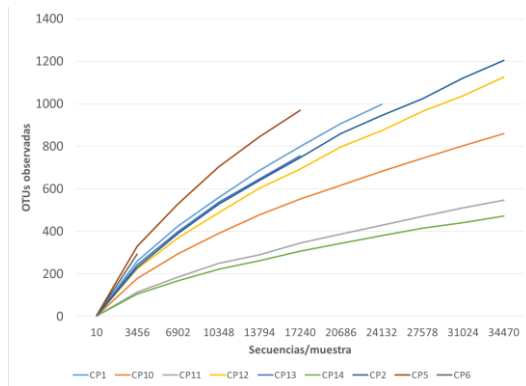
En la tabla 4 se muestran las pendientes promedio que se obtuvieron con cada grupo de muestras, de acuerdo a las pendientes que presentó cada una de las curvas de rarefacción de cada muestra y al número de secuencias obtenidas, la mayoría de las muestras alcanzaron el esfuerzo de muestreo suficiente respecto al número de secuencias obtenidas, a excepción de una muestra de ciego pilórico y dos de intestino proximal.

En la Figura 11 se observa que la pendiente para la muestra CP6 es mayor que el resto (0.08), lo cual nos indica que no se obtuvieron las secuencias suficientes para que la rarefacción alcanzara a llegar hasta las 17240, que fue el promedio en el que la mayoría de las muestras se pudo analizar. En la Figura 12 se observa que la muestra IP6 tuvo la pendiente mayor (0.05) y la muestra IP2 a pesar de que las secuencias no alcanzaron a llegar a las 17240, presentó una pendiente de (0.02) lo cual indica que con las secuencias obtenidas se identificaron el mayor número de especies presentes en la muestra.

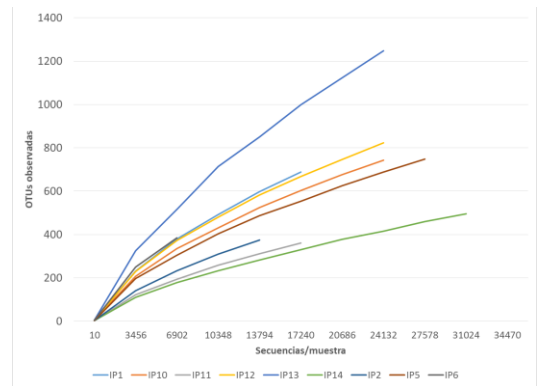


**Tabla 4.** Pendientes promedio de las curvas de rarefacción por tipo de muestra.

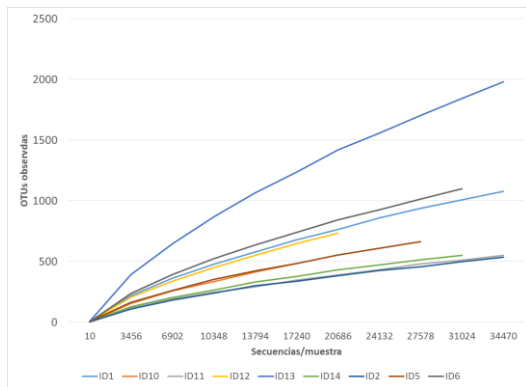
	<b>PROMEDIO PENDIENTE</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>
<b>Raspados de los ciegos pilóricos (CP)</b>	0.0372	0.0127	0.0841
<b>Raspados del Intestino proximal (IP)</b>	0.0324	0.0150	0.0552
<b>Raspados del Intestino Distal (ID)</b>	0.0275	0.0145	0.0543
<b>Heces iniciales (HD1)</b>	0.0298	0.0193	0.0624
<b>Heces día 10 (HD10)</b>	0.0270	0.0180	0.0359
<b>Heces día 20 (HD20)</b>	0.0220	0.0131	0.0312



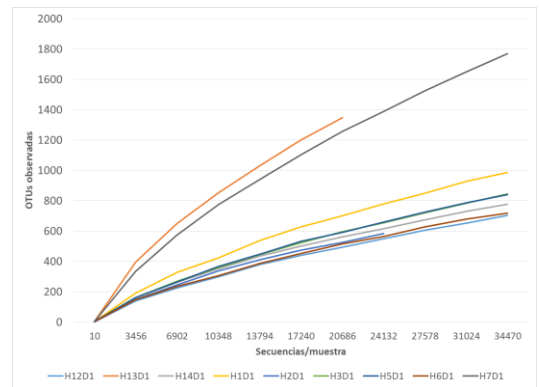
**Figura 11.** Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de raspados de ciegos pilóricos (CP).



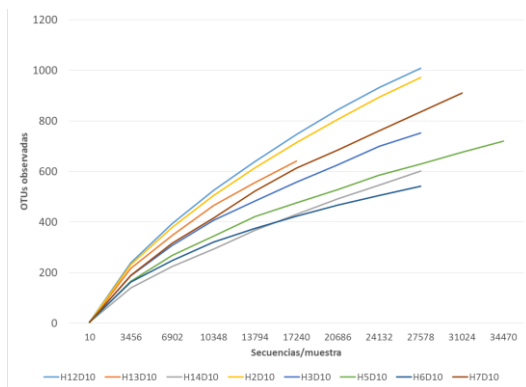
**Figura 12.** Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de raspados de intestino proximal (IP).



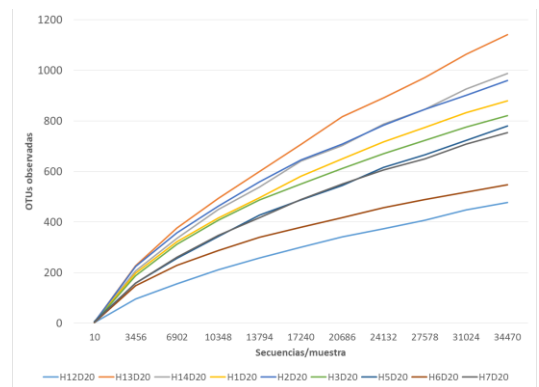
**Figura 13.** Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de raspados de intestino distal (ID).



**Figura 14.** Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de heces iniciales (HD 1).



**Figura 15.** Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de heces del día 10 (HD10).



**Figura 16.** Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de heces del día 20 (HD20).

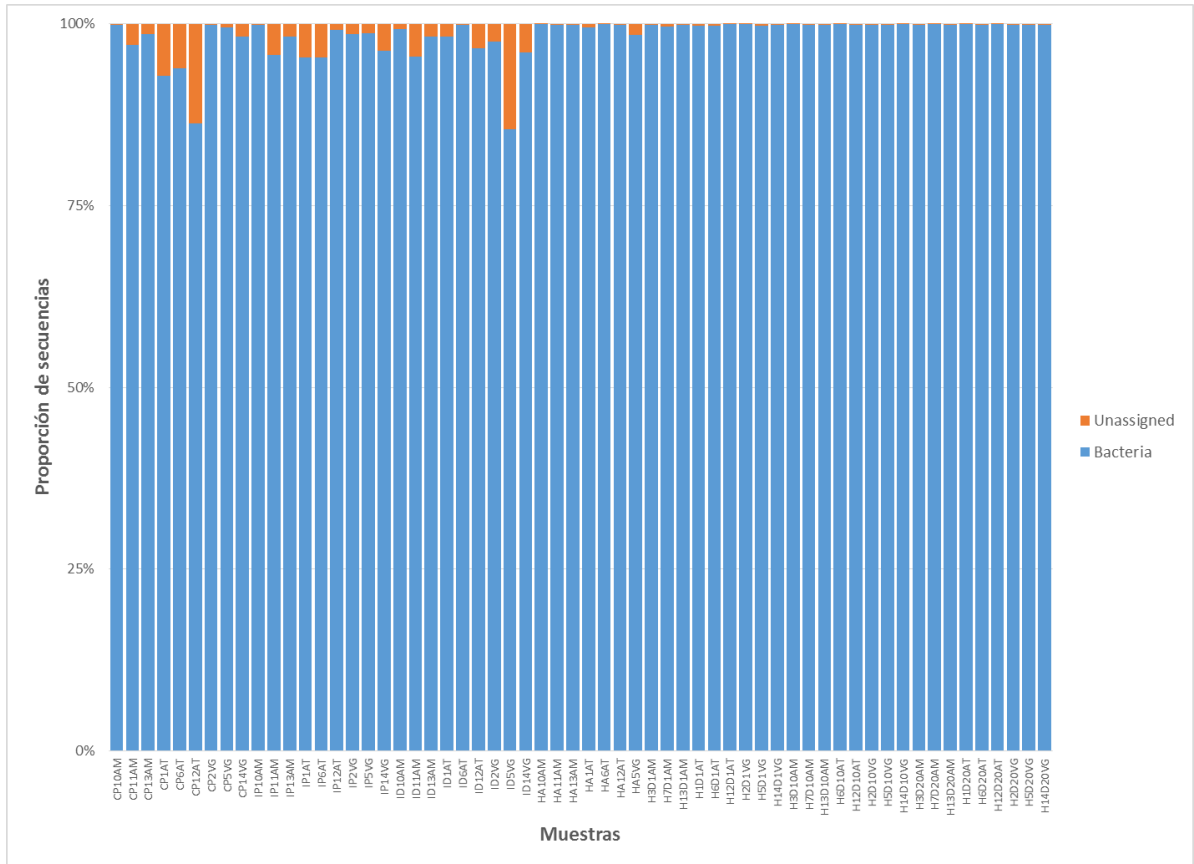
### 7.2.4 Asignación de OTUs

Se obtuvo la cantidad de secuencias no asignadas que no pueden catalogarse como bacterias, y las asignadas al dominio Bacteria. Para cada nivel taxonómico se obtuvo la cantidad de, las secuencias clasificadas y las no clasificadas, que son las OTUs no identificadas en determinados niveles taxonómicos debido a la poca resolución. También se obtuvieron las no asignadas que no se catalogan dentro del dominio bacteria. En total fueron 2'381,858 secuencias asignadas al Dominio Bacteria y 26,794 no clasificadas y no asignadas. De las asignadas al Dominio Bacteria se identificaron 50 phyla, 112 clases, 168 órdenes, 220 familias, 291 géneros y 61 especies. Estos valores se encuentran por encima de lo reportado en otros trabajos metagenómicos (Navarro, 2015; Estruch *et al.*, 2015).

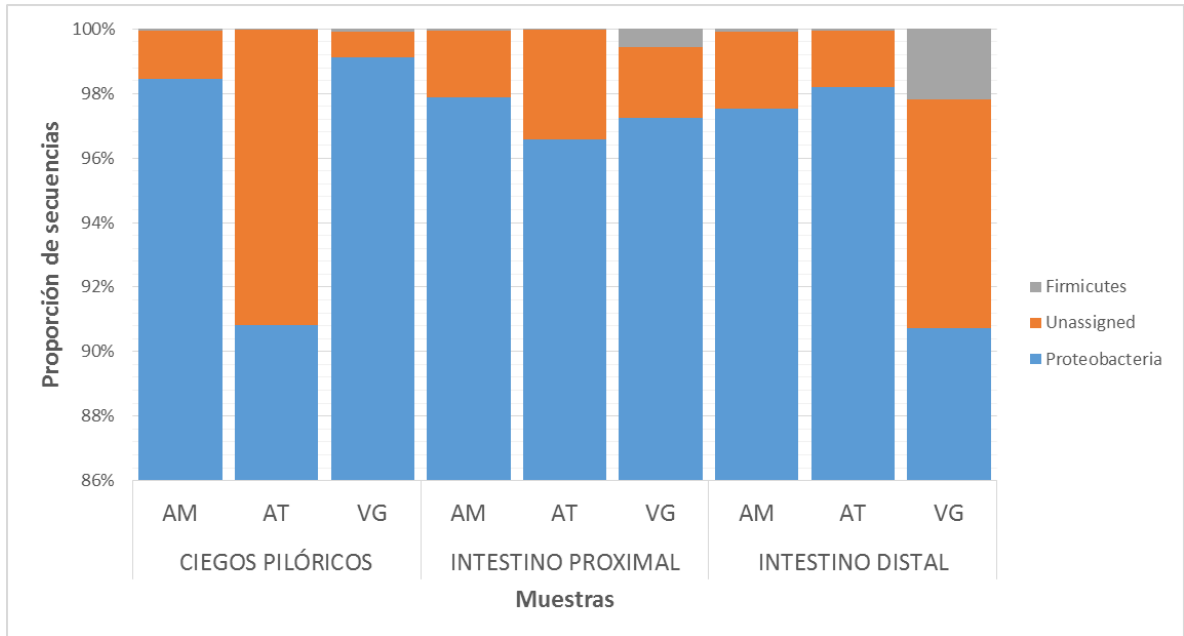
**Tabla 5.** Número de taxa identificados, secuencias asignadas, no asignadas, y no clasificadas con su respectivo número de secuencias de todas las muestras de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<b>Taxa identificados</b>	50	112	168	220	291	61
<b>Secuencias asignadas</b>	2,381,817	2,381,635	1,237,533	1,229,162	427,660	92,681
<b>Secuencias no clasificadas</b>	41	223	1'144,325	1'152,696	1'954,198	2'289,177
<b>Secuencias no asignadas</b>	26,794	26,794	26,794	26,794	26,794	26,794

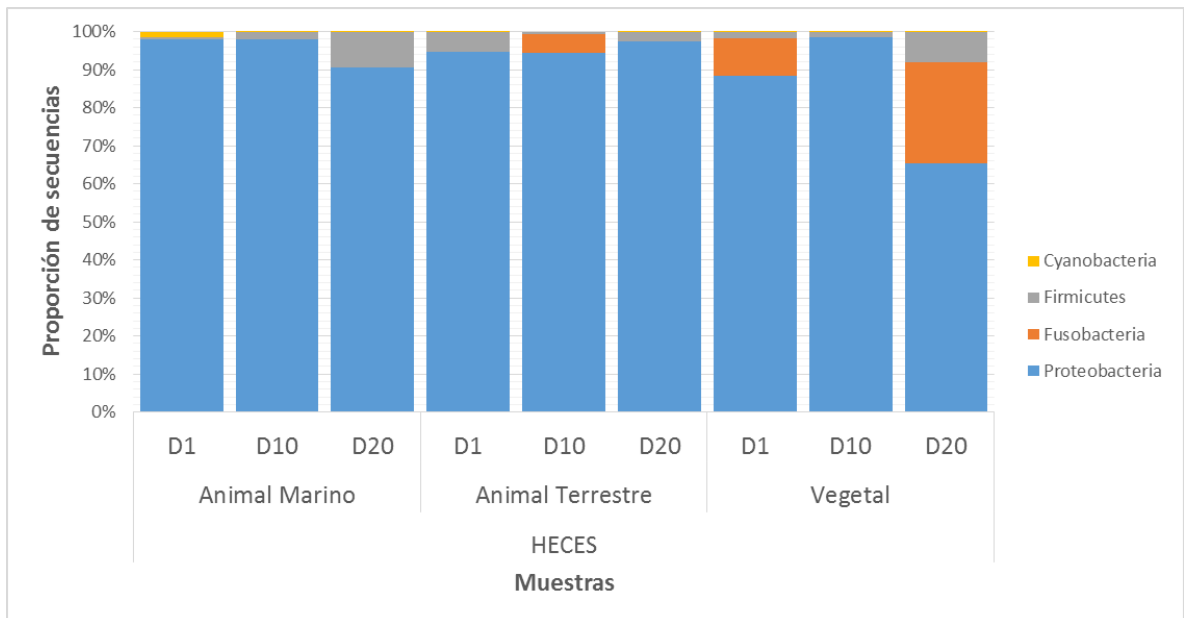
Todas las muestras de heces tuvieron una asignación de secuencias superior al 95%, similar a la mayoría de las muestras de raspados de órganos, con excepción de cuatro, dos mayor al 90% (CP1AT y CP12AT) y dos superior al 85% (CP6AT y ID5VG) (Figura 17).



**Figura 17.** Gráfica de proporción de secuencias asignadas como bacterias y no asignadas de las muestras de heces y raspados de órganos.

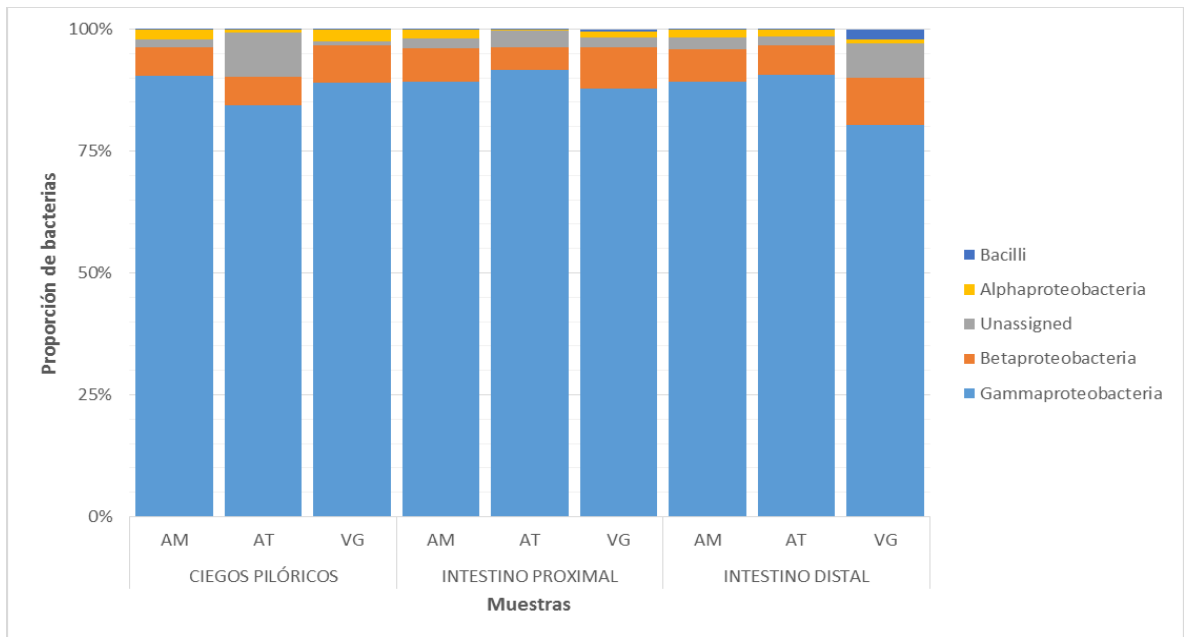


**Figura 18.** Estructura de la microbiota residente a nivel phylum de *L. guttatus* alimentados con diferentes dietas. AM= Dieta Animal Marino, AT= Dieta Animal Terrestre, VG= Dieta Vegetal.

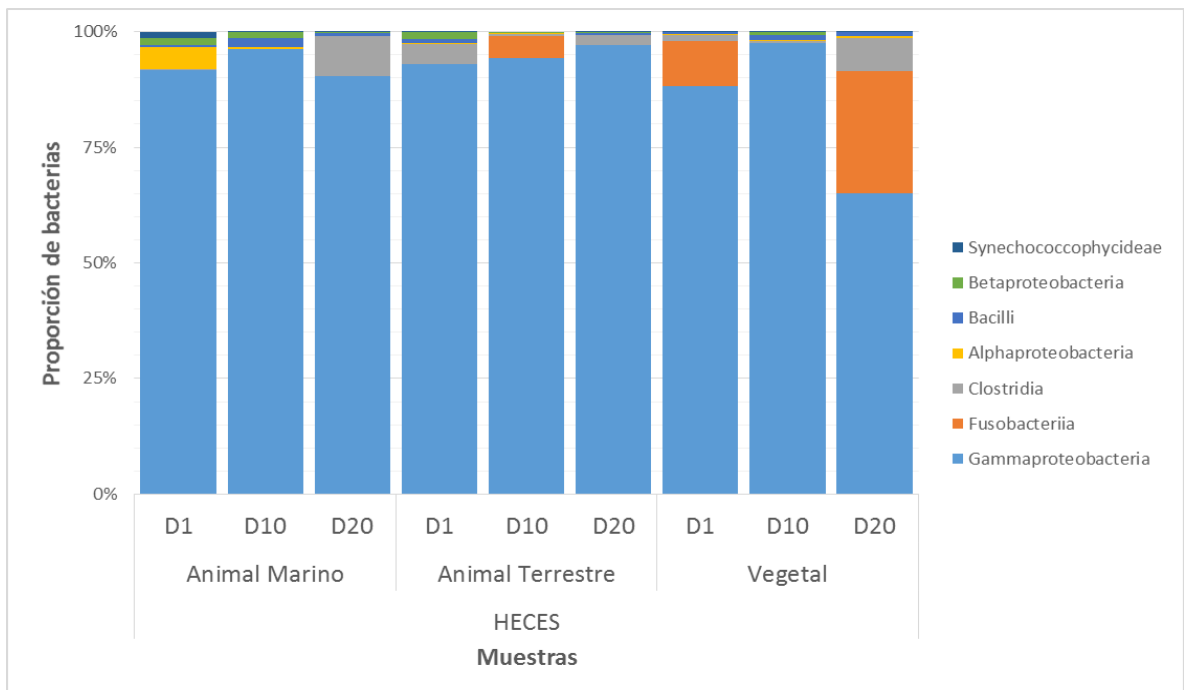


**Figura 19.** Estructura de la microbiota transitoria a nivel phylum de *L. guttatus* alimentados con diferentes dietas. D1=Día 1, D10= Día 10, D20= Día 20.

Los phyla que se presentaron con una proporción mayor al 1 % en la microbiota residente son *Proteobacteria* acompañado de *Firmicutes* (Figura 18), similar presencia se encontró en la microbiota transitoria además de *Fusobacteria* y *Cyanobacteria*.

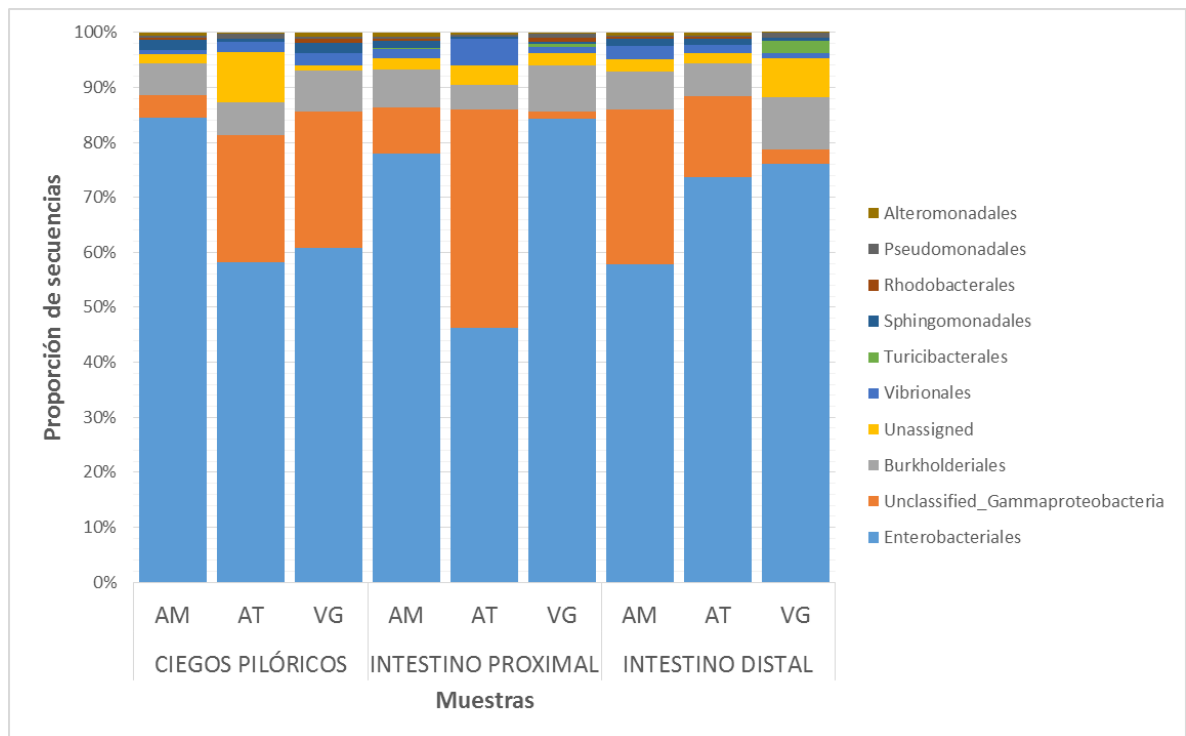


**Figura 20.** Estructura de la microbiota residente a nivel clase de *L. guttatus* alimentados con diferentes dietas. AM= Dieta Animal Marino, AT= Dieta Animal Terrestre, VG= Dieta Vegetal.

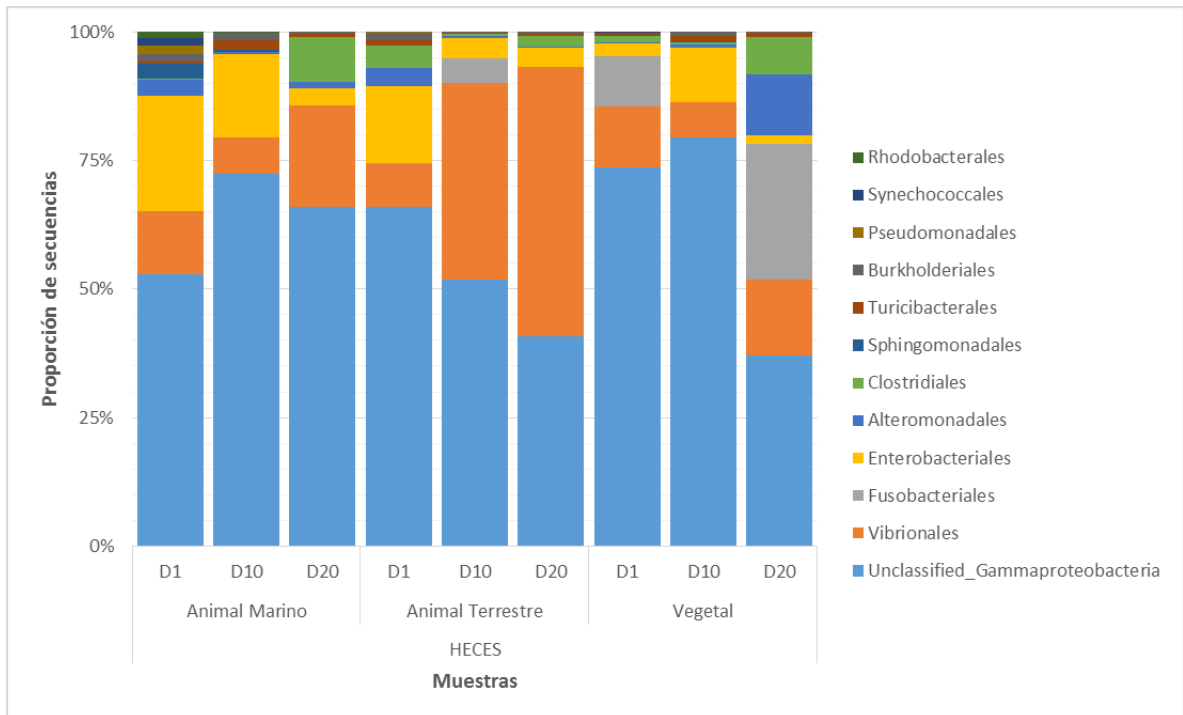


**Figura 21.** Estructura de la microbiota transitoria a nivel clase de *L. guttatus* alimentados con diferentes dietas. D1=Día 1, D10= Día 10, D20= Día 20.

En la microbiota residente se presentaron las clases *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Bacilli* (Figura 20), similar que para la microbiota transitoria además de las clases *Fusobacteria*, *Clostridia*, *Synechococcophycidae* (Figura 21).



**Figura 22.** Estructura de la microbiota residente a nivel orden de *L. guttatus* alimentados con diferentes dietas. AM= Dieta Animal Marino, AT= Dieta Animal Terrestre, VG= Dieta Vegetal.

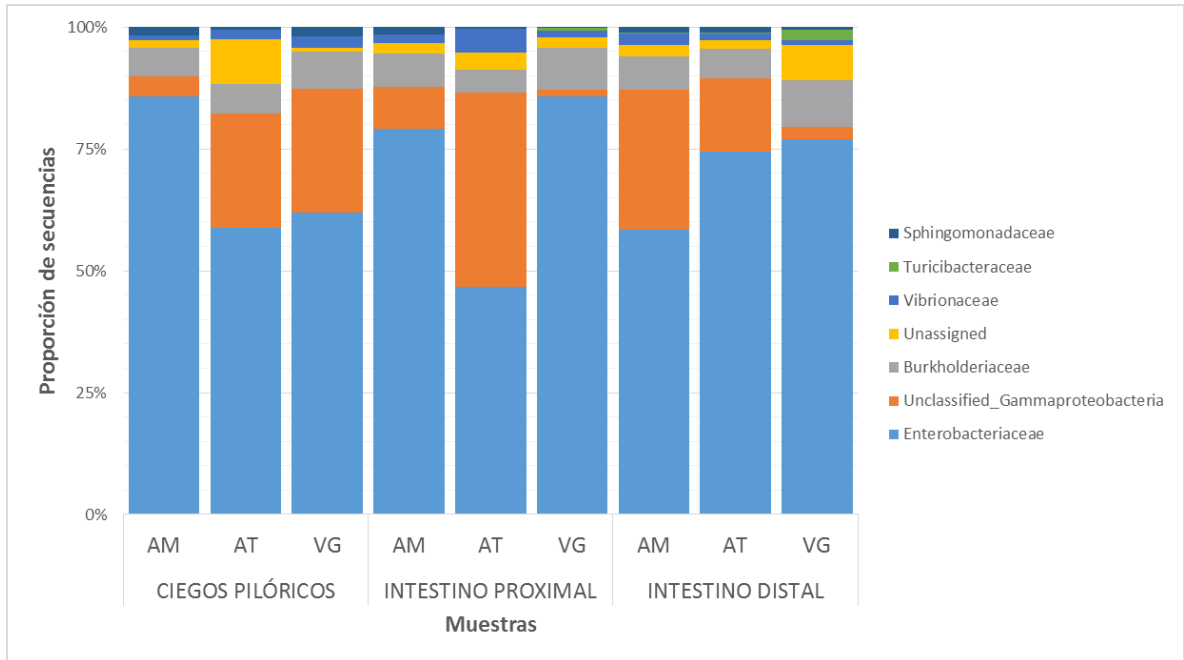


**Figura 23.** Estructura de la microbiota transitoria a nivel orden de *L. guttatus* alimentados con diferentes dietas. D1=Día 1, D10= Día 10, D20= Día 20.

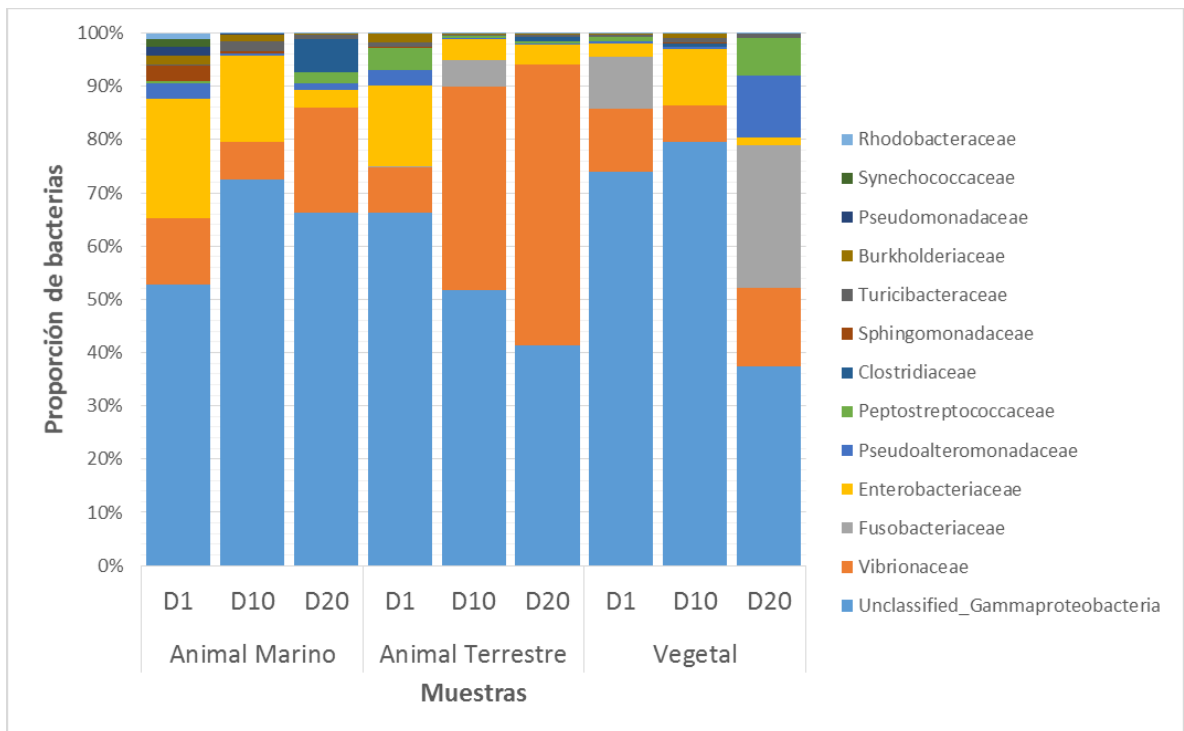
A nivel orden la estructura de la microbiota transitoria estuvo representada principalmente por *Gammaproteobacterias no clasificadas*, *Vibrionales*, *Enterobacterales*, *Fusobacterales*, *Alteromonadales*, *Clostridiales*, *Turicibacterales*, *Burkholderiales*, *Pseudomonadales*, *Synechococcales*, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales* (Figura 23).

La composición de la microbiota residente se integró principalmente de los órdenes *Enterobacterales*, *Gammaproteobacterias no clasificadas*, *Burkholderiales*, *Vibrionales*, *Sphingomonadales*, *Turicibacterales*, *Rhodobacterales*, *Pseudomonadales*, *Alteromonadales* (Figura 22).





**Figura 24.** Estructura de la microbiota residente a nivel familia de *L. guttatus* alimentados con diferentes dietas. AM= Dieta Animal Marino, AT= Dieta Animal Terrestre, VG= Dieta Vegetal.



**Figura 25.** Estructura de la microbiota transitoria a nivel familia de *L. guttatus* alimentados con diferentes dietas. D1=Día 1, D10= Día 10, D20= Día 20.

La microbiota residente presentó a las familias *Enterobacteriaceae*, *Gammaproteobacterias no clasificadas*, *Burkholderiaceae*, *Turicibacteraceae*, *Sphingomonadaceae* y *Vibrionaceae* con una asignación de secuencias mayor al 1% (Figura 24).

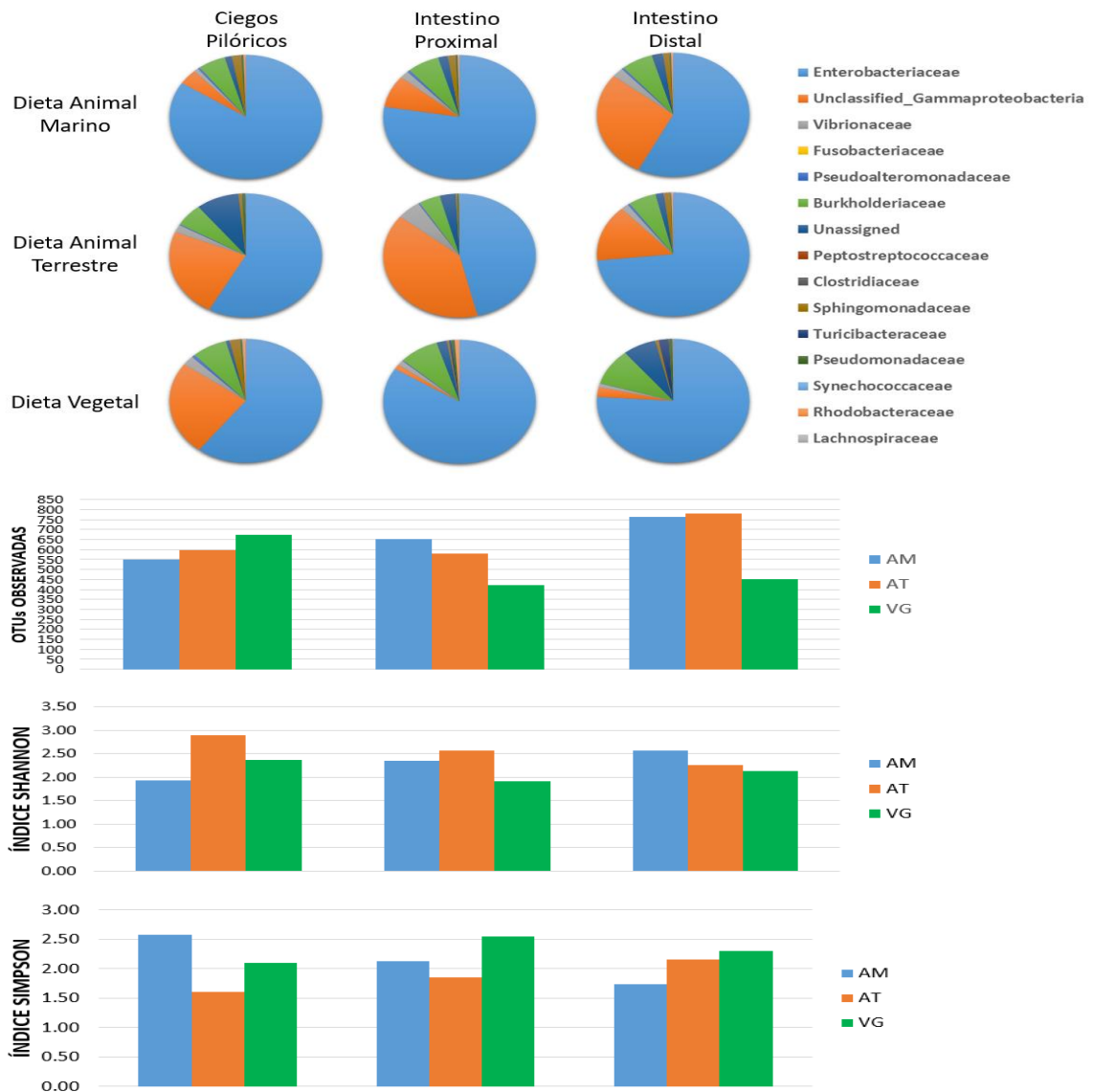
Para la microbiota transitoria la estructura bacteriana a nivel familia con proporción mayor al 1% fueron *Gammaproteobacterias no clasificadas*, *Fusobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Turicibacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Synechococcaceae* y *Rhodobacteraceae* (Figura 25).

Existen OTUs que se encuentran en todas las muestras, tanto de raspados de los órganos como en las heces, las cuales el programa QIIME calcula como core microbioma (microbioma núcleo) (Tabla 6).

**Tabla 6.** OTUs encontradas en todas las muestras (microbioma núcleo)

Phylum	Class	Order	Family	Genus
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	-	-	-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	-

## 7.2.5. Diversidad alfa de la microbiota residente



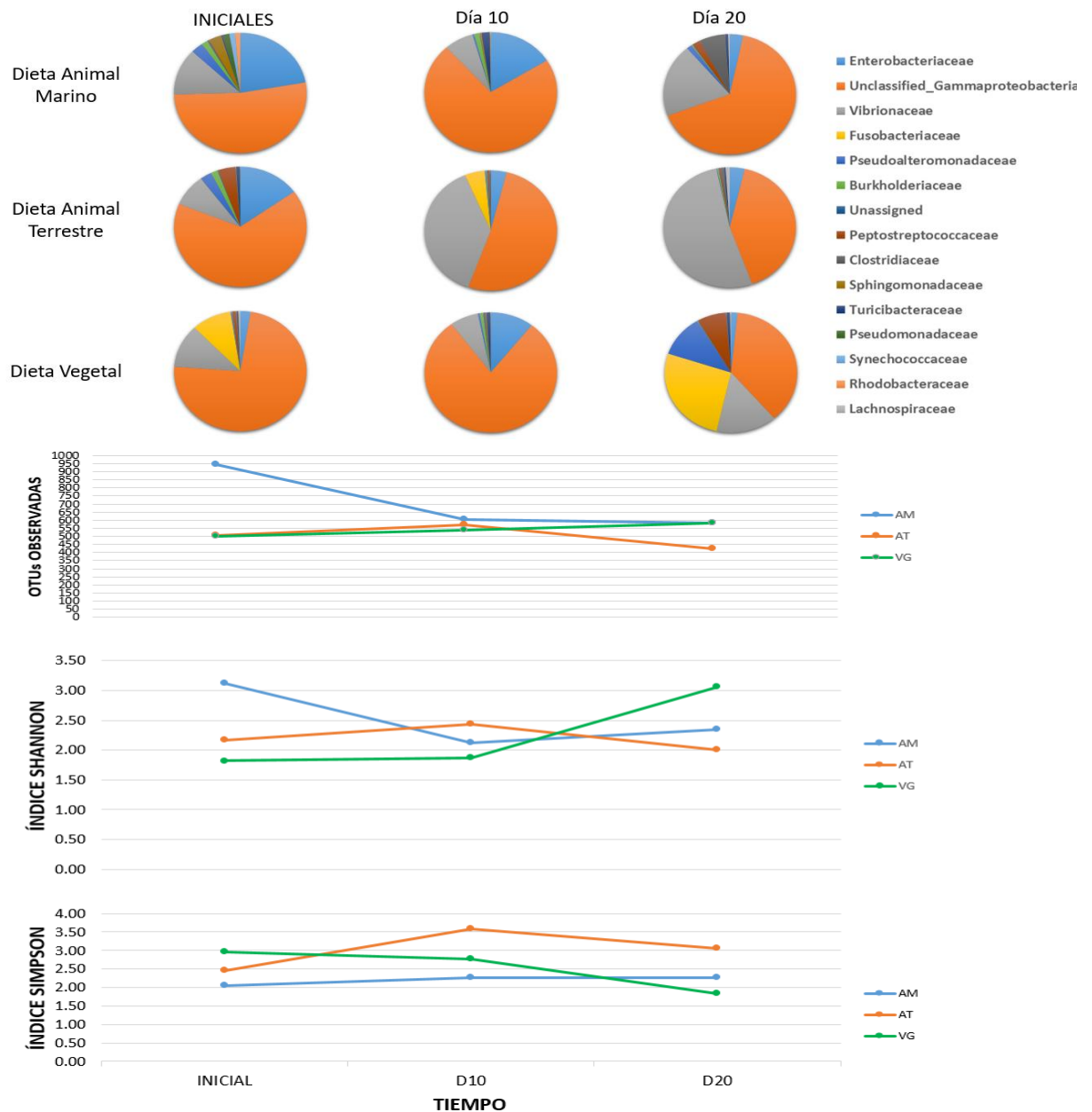
**Figura 26.** Índices de diversidad de la microbiota residente presente en muestras de ciegos pilóricos, intestino proximal, intestino distal de *L. guttatus* alimentados con dietas con diferentes fuentes de proteína.

Ciegos pilóricos: la dominancia (*Índice de Simpson*) fue mayor en la dieta AM, seguida de la dieta VG y la dieta AT, mientras que la equidad (*Índice Shannon*) fue mayor en dieta AT, seguido de dieta VG y la menor la dieta AM. La riqueza (especies observadas) fue mayor para la dieta VG, seguida de la dieta AT y VG (Figura 26).

Intestino proximal: la dominancia fue mayor en la dieta VG, seguida de la dieta AM y por último la dieta AT; la equidad fue ligeramente mayor en la dieta AT que en la dieta AM y la dieta VG presentó el menor valor; la riqueza (especies observadas) fue mayor en la dieta AM, seguido de la dieta AT y la VG (Figura 26).

Intestino distal: presentó menor dominancia la dieta AM, seguida de la dieta AT y la mayor fue la de la dieta VG; con respecto a la equidad fue mayor en dieta AM, seguida de la dieta AT y VG; las especies observadas fue ligeramente mayor en dieta AT que en la dieta AM y la VG presentó el menor índice (Figura 26).

## 7.2.6. Diversidad alfa de la microbiota transitoria



**Figura 27.** Índices de diversidad de muestras de heces (microbiota transitoria) de *L. guttatus* alimentados con dietas con diferente fuente de proteína.

Diez días después de haber alimentado a los peces con dietas de diferente fuente de proteína, la dominancia se mantiene en heces de peces alimentados con dieta AM, mientras que la equidad y las especies observadas disminuyeron con esta

dieta. Se observa que con la dieta AT aumentó la dominancia y la equidad y ligeramente las especies observadas a diferencia de la dieta VG disminuyó ligeramente la dominancia, se mantuvo la equidad y las especies observadas. Diez días después de nuevamente alimentarlos con la dieta AM a todos los peces de los tratamientos, se observa que con esta dieta los índices de diversidad se mantienen, mientras que con la dieta AT disminuyen; en el caso de la dieta VG aumenta considerablemente la equidad y disminuye la dominancia, las especies observadas incrementan ligeramente (Figura 27).

#### **7.2.7. Diversidad beta.**

Se observa que al hacer un corte a una distancia de 0.06 se forma el agrupamiento de 5 conglomerados, el conglomerado (a) sólo se compone de muestras de heces. El conglomerado (b) solo lo conforma una muestra de heces de peces alimentado con dieta VG. El conglomerado (c) se conforma principalmente por las muestras de microbiota residente, y solo una muestra de microbiota transitoria de dieta AM. El conglomerado (d) compuesto por una muestra de heces de peces alimentado con dieta AT y uno alimentado con dieta AM al inicio del experimento. El conglomerado (e) mayoritariamente compuesto por muestras de heces, también contiene una muestra de IP, una de ID y dos de CP de peces alimentados con la dieta AT; una muestra de ciegos pilóricos de los peces alimentados con la dieta VG y una muestra de ID de peces alimentados con dieta AM (Figura 28).

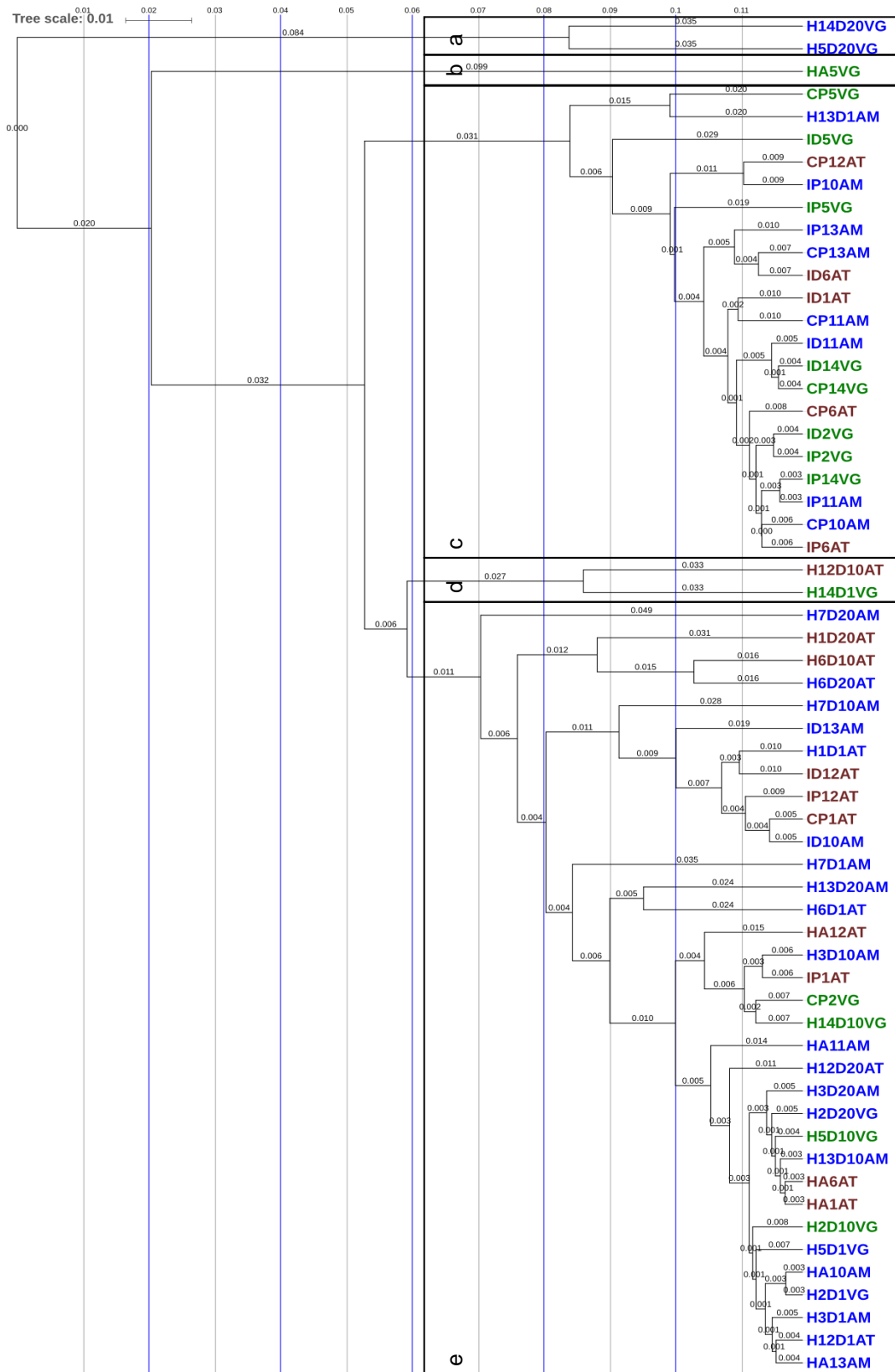
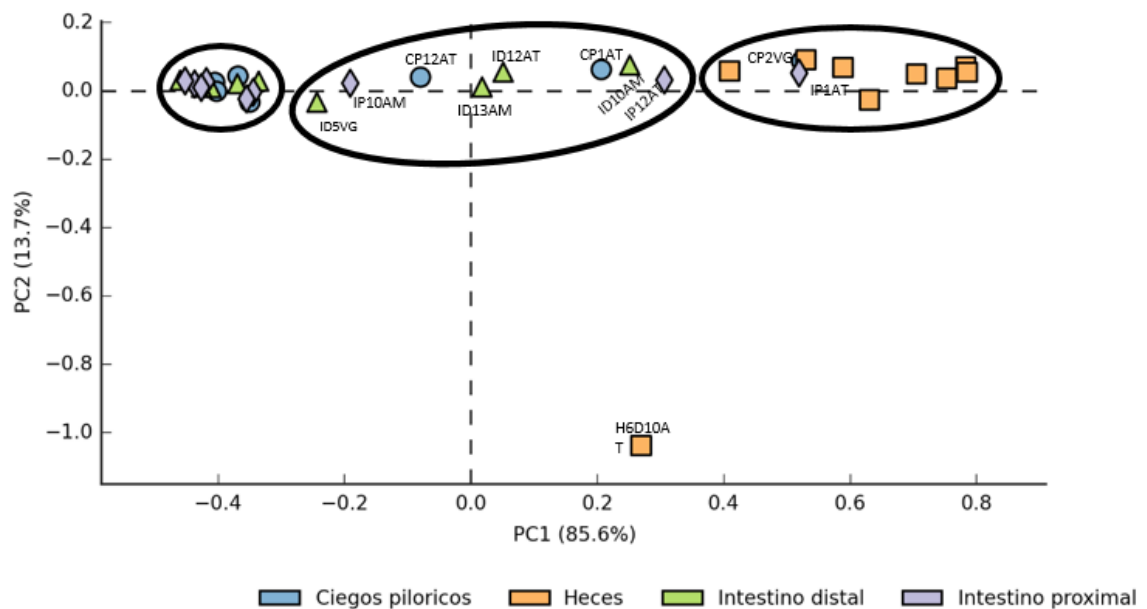


Figura 28. Diversidad Beta de todas las muestras analizadas.

Nota: La primer letra corresponde al tipo de muestra: H=heces de peces marcado, HA=heces de peces acompañantes, CP= ciegos pilóricos, IP= intestino proximal, ID= intestino distal. El dígito siguiente corresponde al tanque de donde se obtuvo la muestra. D1= inicial, D10= día 10, D20= día 20.

### 7.2.8 Análisis estadístico de la estructura bacteriana

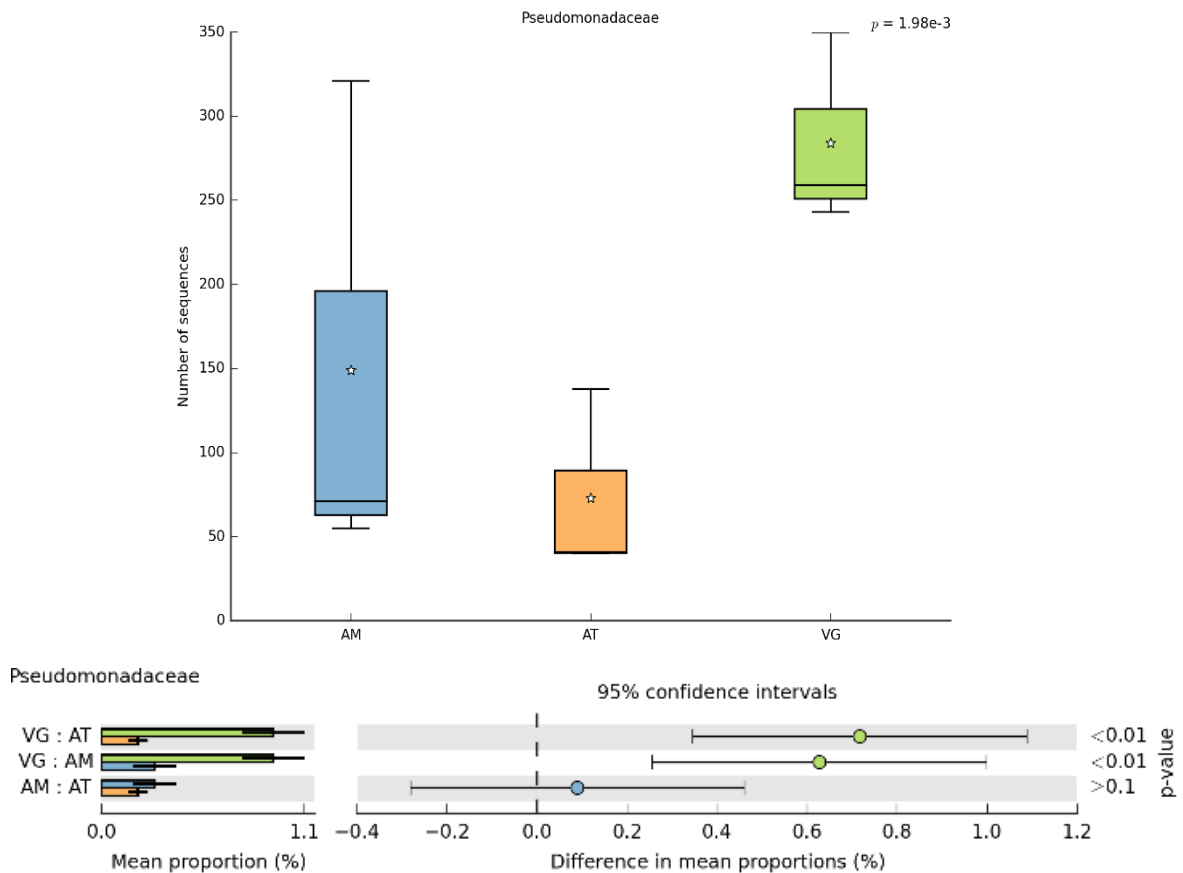
Se observa claramente dos agrupaciones en heces (microbiota transitoria) y para los raspados de órganos (microbiota residente); a su vez se observa un agrupamiento intermedio compuesto principalmente por microbiota residente (datos extremos) de peces alimentados con dieta AT y AM (Figura 29).



**Figura 29.** Distribución de las muestras en el Análisis de Componentes Principales a nivel familia de microbiota residente y transitoria de *L. guttatus* alimentado con diferentes fuentes de proteína en la dieta.

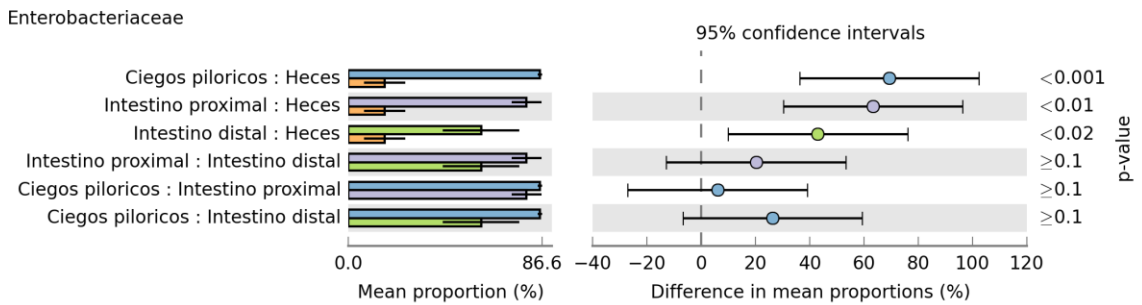
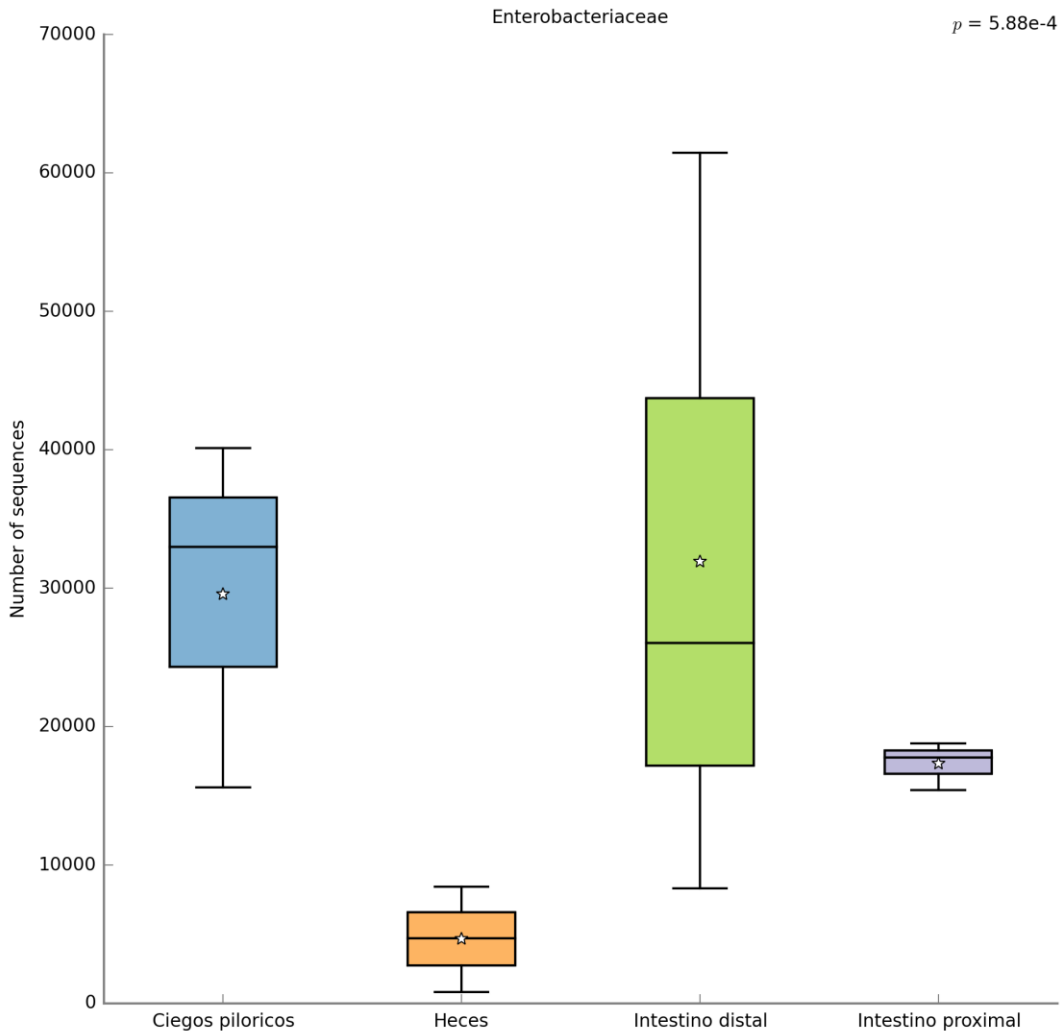
Se encontró diferencias significativas en la microbiota residente del intestino distal de peces alimentados con diferentes fuentes de proteína, incrementando la presencia de la familia *Pseudomonadaceae* en peces alimentados con dieta VG (Figura 30).



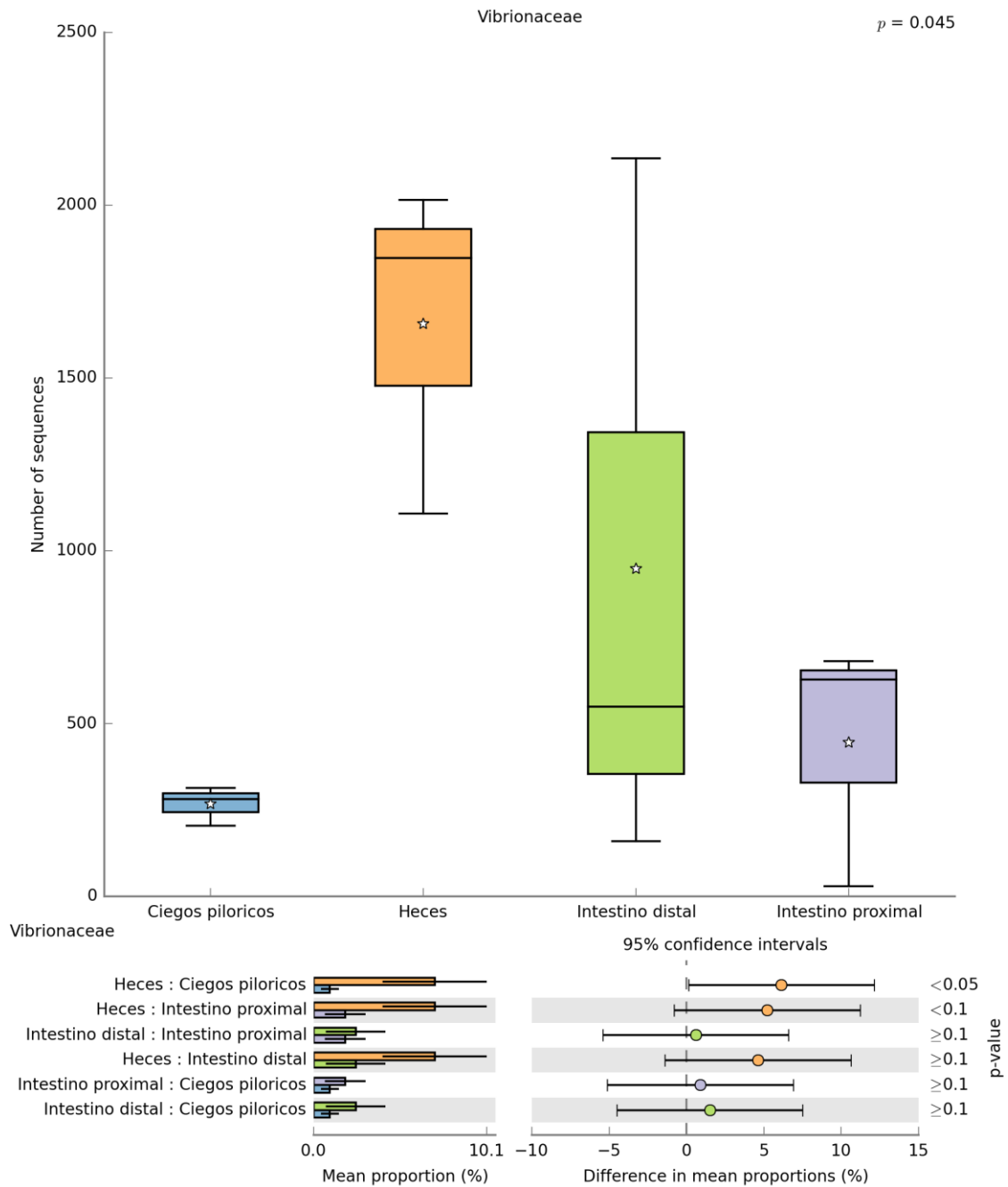


**Figura 30.** Gráficos de cajas y bigotes con análisis *a posteriori* en el que se representa el número de secuencias en la familia *Pseudomonadaceae* que presentó diferencias significativas en intestino distal de *L. guttatus* alimentado diferentes fuentes de proteína en la dieta.

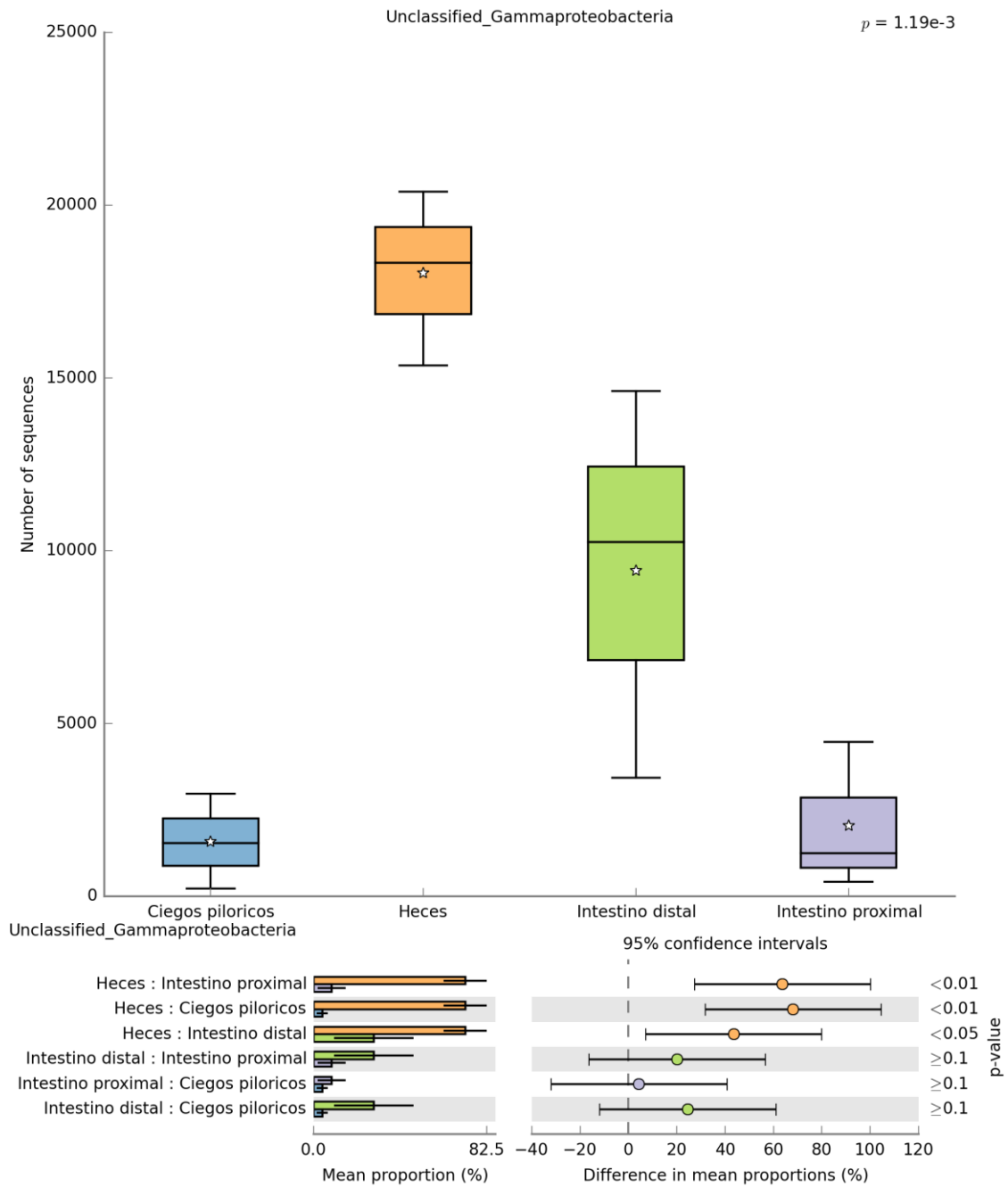
7.2.8.1 Composición de la microbiota de los peces alimentados con la dieta animal marino. Las heces de los peces alimentados con la dieta AM presentó un significativo menor número de secuencias de la familia *Enterobacteriaceae* que en los ciegos pilóricos, intestino proximal y distal ( $P= 5.88e^{-4}$ ) (Figura 31), a diferencia de las *Gamaproteobacterias* ( $P= 1.19e^{-3}$ ) que ambas presentaron un mayor número de secuencias en heces con respecto a los mismos órganos (Figura 33) y la familia *Vibrionaceae* ( $P= 0.045$ ) (Figura 32) que presentó significativamente un mayor número de secuencias en heces que en ciegos pilóricos y el intestino proximal, mas no en el intestino distal.



**Figura 31.** Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis *a posteriori* en el que se representa el número de secuencias en la familia *Enterobacteriaceae* en las diferentes secciones del intestino y heces de *L. guttatus* alimentado con dieta AM.

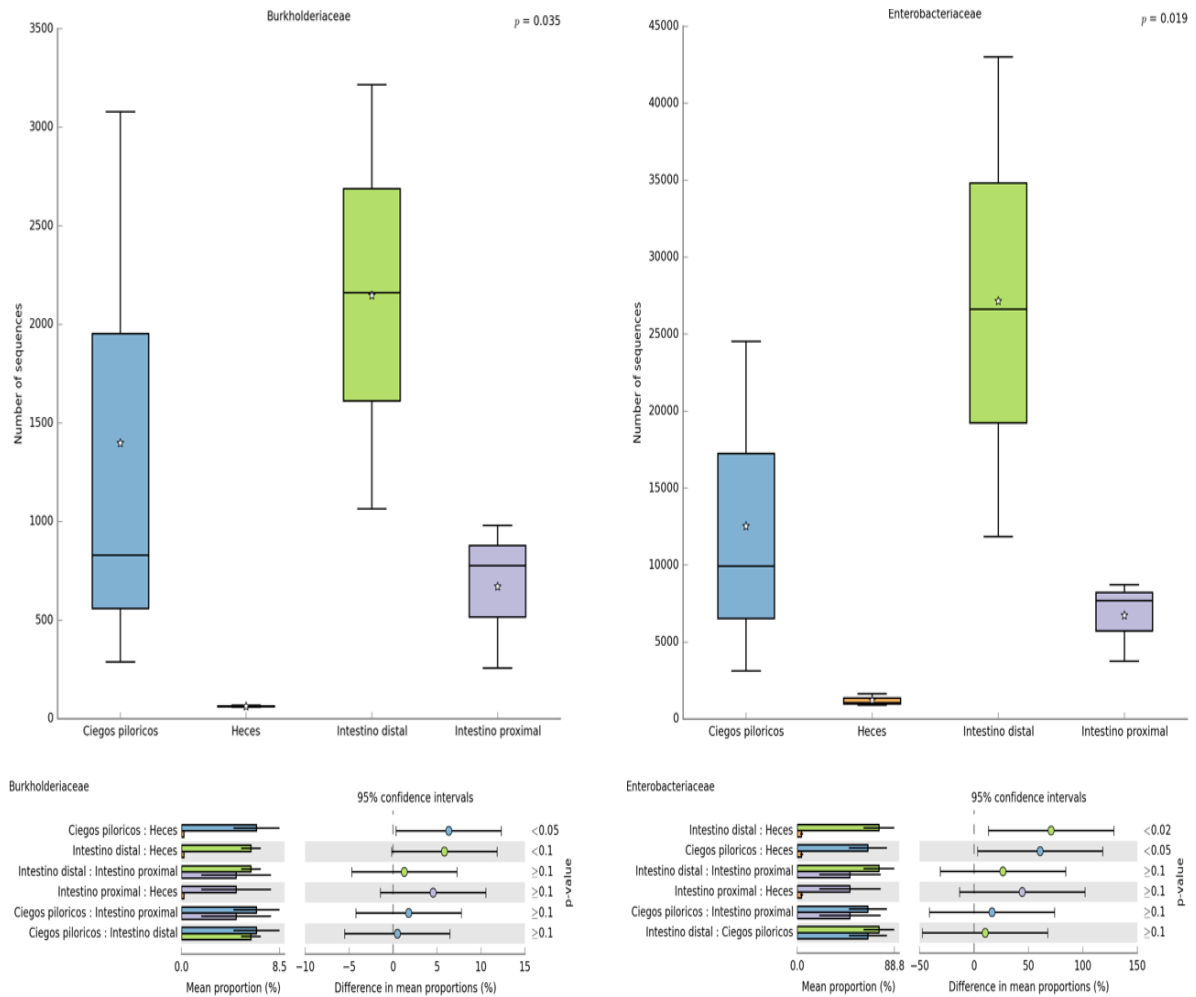


**Figura 32.** Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis *a posteriori* en el que se representa el número de secuencias en la familia *Vibrionaceae* en las diferentes secciones del intestino y heces de *L. guttatus* alimentado con dieta AM.



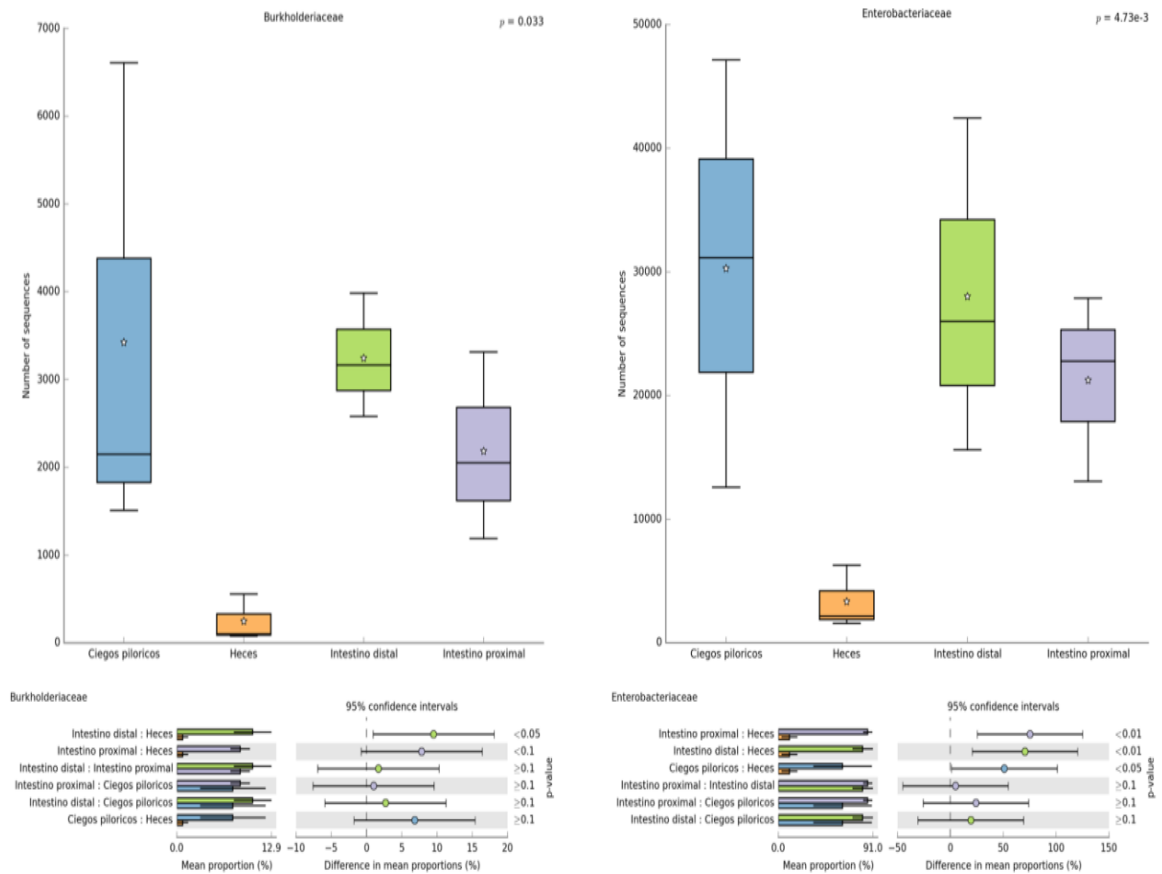
**Figura 33.** Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis *a posteriori* en el que se representa el número de secuencias de *Gamaproteobacterias* en las diferentes secciones del intestino y heces de *L. guttatus* alimentado con dieta AM.

7.2.8.2. Composición de la microbiota de los peces alimentados con la dieta animal terrestre. La microbiota de los ciegos pilóricos y el intestino distal de peces alimentados con dieta AT presentó un número significativamente menor número de secuencias de las familias *Burkholderiaceae* ( $P= 0.035$ ) y *Enterobacteriaceae* ( $P= 0.019$ ) que en las heces y en el intestino distal (Figura 34).

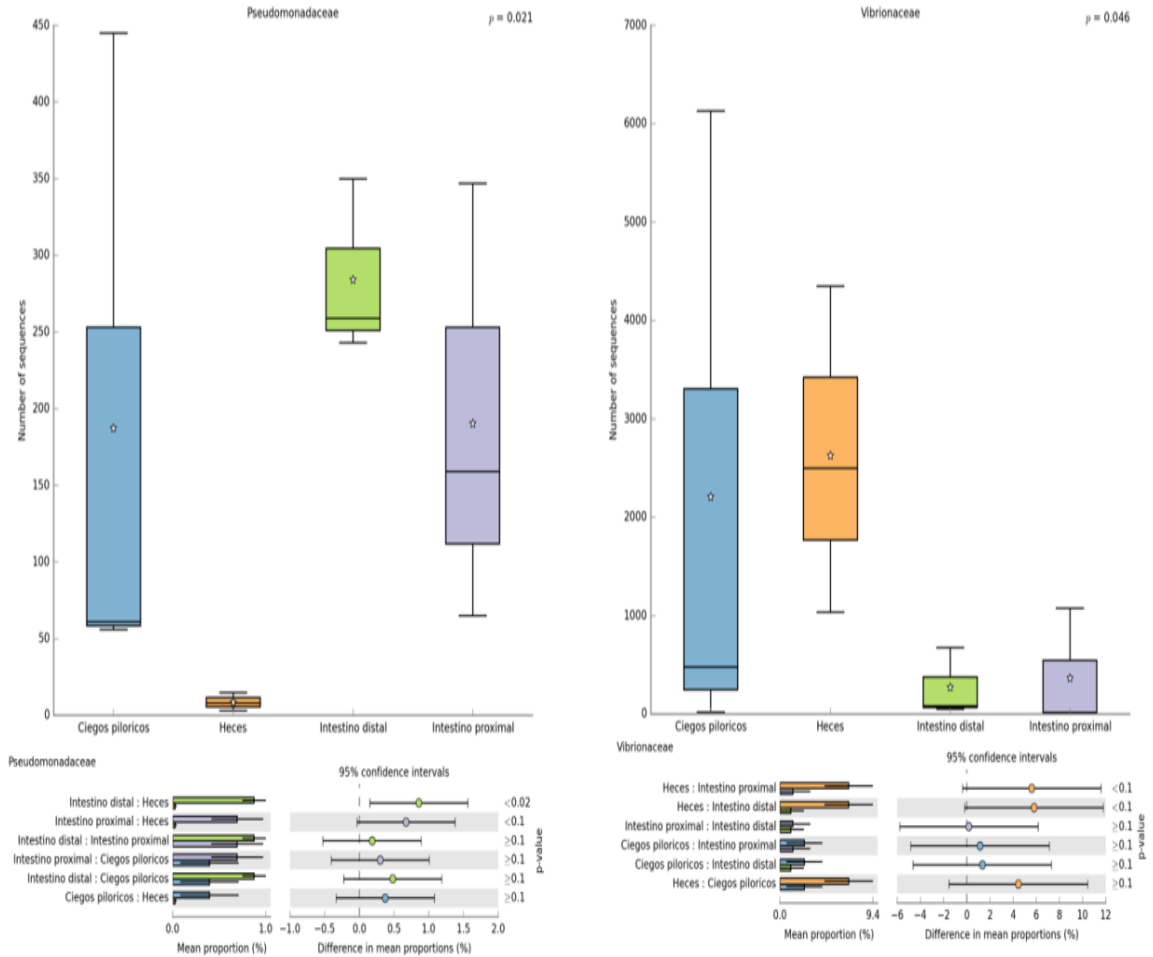


**Figura 34.** Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis *a posteriori* en el que se representa el número de secuencias en las familias que presentaron diferencias significativas en las diferentes secciones del intestino y heces de *L. guttatus* alimentado con dieta AT.

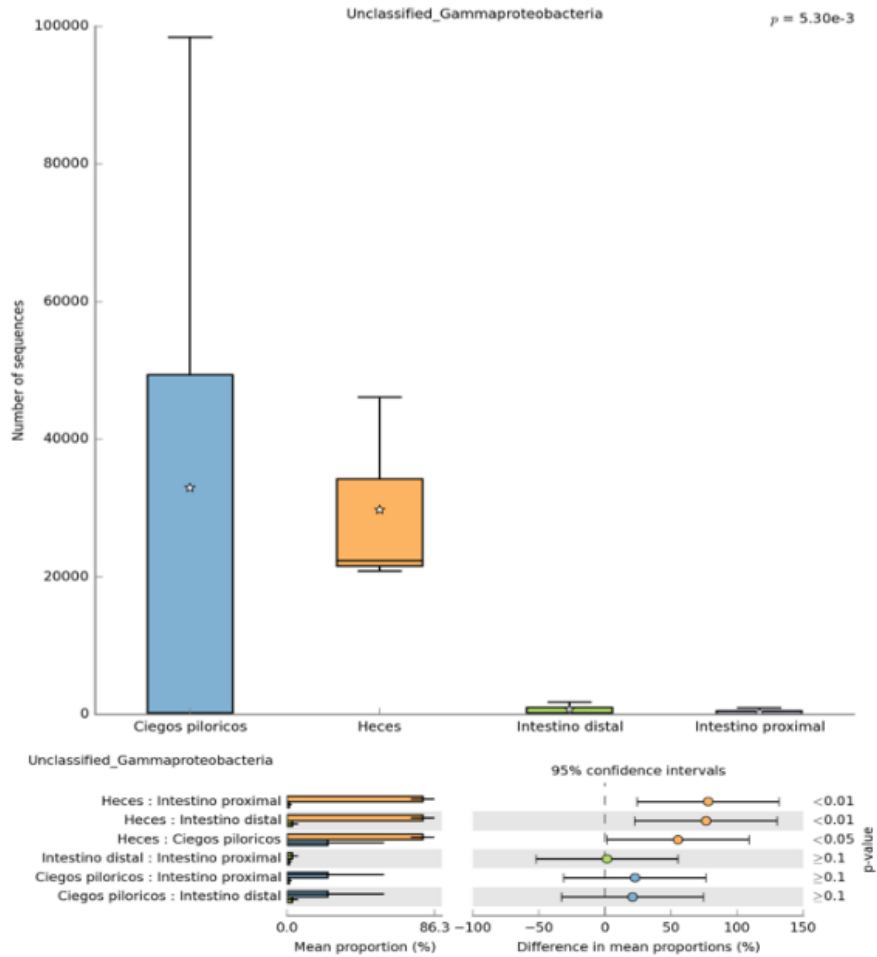
7.2.8.3. Composición de la microbiota de los peces alimentados con la dieta vegetal. Las heces de los peces alimentados con dieta VG presentaron un número significativamente menor de secuencias de las familias *Burkholderiaceae* ( $P= 0.033$ ) y *Pseudomonadaceae* ( $P= 0.021$ ) con respecto a intestino proximal y distal (Figura 35 y 36); la microbiota residente presentó un número significativamente menor de secuencias de la familia *Enterobacteriaceae* ( $P= 4.73e^{-4}$ ) que en las heces (Figura 35). Las heces y ciegos pilóricos presentaron un número significativamente mayor de secuencias en la familia *Vibrionaceae* ( $P= 0.046$ ) que en intestino proximal y distal (Figura 36). En microbiota residente se presentó un número significativamente menor de secuencias de *Gamaproteobacterias* ( $P= 5.30e^{-3}$ ) que en las heces (Figura 37).



**Figura 35.** Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis *a posteriori* en el que se representa el número de secuencias de las familias *Burkholderiaceae* y *Enterobacteriaceae* en las diferentes secciones del intestino y heces de *L. guttatus* alimentado con dieta VG.



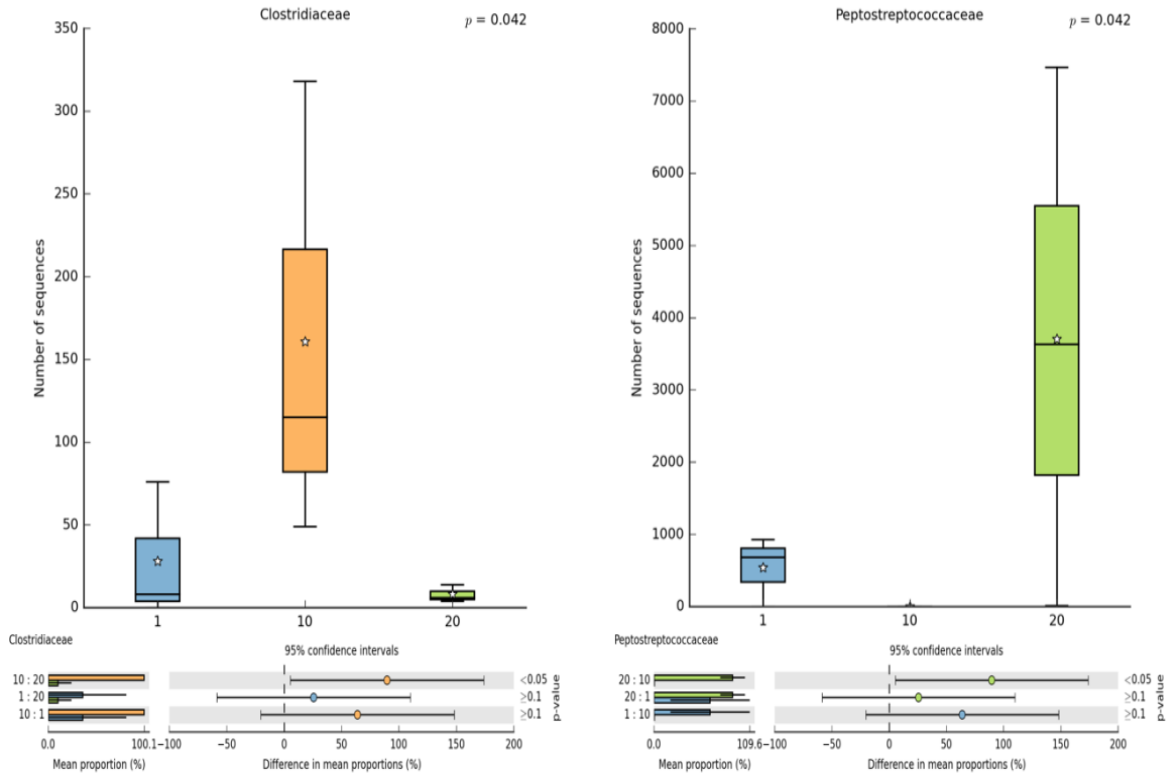
**Figura 36.** Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis *a posteriori* en el que se representa el número de secuencias de las familias *Pseudomonadaceae* y *Vibrionaceae* en las diferentes secciones del intestino y heces de *L. guttatus* alimentado con dieta VG.



**Figura 37.** Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis *a posteriori* en el que se representa el número de secuencias de las Gammaproteobacterias en las diferentes secciones del intestino y heces de *L. guttatus* alimentado con dieta VG.

Al evaluar las diferencias en microbiota transitoria a través de los periodos de alimentación, las heces de los peces alimentados con dieta VG presentaron diferencias significativas a través de los tres diferentes periodos de alimentación. Las familias significativamente diferentes fueron *Clostridiaceae* ( $P= 0.042$ ) con mayor número de secuencias cuando se alimentó con dieta VG durante 10 días y *Peptostreptococcaceae* aumentó significativamente ( $P= 0.042$ ) cuando nuevamente se alimentó con dieta AM por un periodo de 10 días (Figura 38).





**Figura 38.** Gráficos de cajas y bigotes así como su respectivo análisis *a posteriori* en el que se representa el número de secuencias en las familias que presentaron diferencias significativas en heces de *L. guttatus* alimentado al inicio con dieta AM (1), 10 días con dieta VG (10) y posteriormente 10 días con dieta AM nuevamente (20).

## VIII. DISCUSIONES

El presente trabajo es pionero en estudiar a nivel metagenómico la microbiota del pargo flamenco alimentado con diferentes tipos de dieta. Se compara el efecto de las proteínas de origen animal marino, vegetal y animal terrestre sobre la microbiota residente de distintas secciones del tracto intestinal y ciegos pilóricos así como la microbiota transitoria, resultados que complementan los estudios de nutrición de la especie.

En la microbiota transitoria evaluada mediante las heces de peces que fueron alimentados con la dieta VG y posteriormente con dieta AM, se presentó una disminución considerable de *Proteobacteria* (64.6%) y un aumento en *Fusobacteria* (26.25%) y *Firmicutes* (8.04%). Esta condición de alimentación fue la que mayores diferencias significativas presentó en el análisis de componentes principales. Las métricas de diversidad (riqueza, Chao1 y Shannon) no presentaron diferencias significativas lo cual concuerda con un estudio realizado en la dorada *Sparus aurata* en el que no encontraron diferencias significativas en estos parámetros en peces alimentados con dieta con harina de pescado y dieta totalmente vegetal. A pesar de esto, se presentó una tendencia de disminución en la dominancia (índice Simpson) después de 10 días de ser alimentados diariamente con dieta VG y un aumento considerable de equidad (índice de Shannon) y disminución de dominancia 10 días después de haber sido alimentados nuevamente con dieta AM. Este resultado pudiera indicar que una dieta basada en proteína vegetal disminuye considerablemente la diversidad de la microbiota, y al volver a alimentar los organismos con dieta AM la aumenta, lo que ocasiona las mayores diferencias significativas en las especies de bacterias que se encuentran presentes en este grupo de estudio. Este cambio pudiera deberse a la disponibilidad de los nutrientes que constituyen cada una de las dietas. Una dieta totalmente vegetal aumenta la cantidad de carbohidratos no almidonados y otros antinutrientes como los taninos, que pueden causar la

disminución de la disponibilidad de nutrientes incluidos los aminoácidos, esto produce imbalance (Li *et al.*, 2007), y presenta menores índices de digestibilidad aparente, que puede ser atribuido a la interferencia de los carbohidratos o contenido de fibra que son digeridos en cantidades muy bajas en peces carnívoros (Hernández *et al.*, 2015). Los cambios que se presentan en los peces carnívoros al alimentarlos con dieta con proteína de origen vegetal reflejan que las diferentes condiciones nutricionales permiten que diferentes grupos de bacterias se establezcan en el trato intestinal, reduciéndose el número de bacterias dominantes y esto permite que se eleve el número de secuencias detectadas de otras bacterias (Heikkinen *et al.*, 2006).

En heces, la familia *Clostridiaceae* tuvo un aumento significativo al día 10 de ser alimentados con la dieta VG, y una disminución significativa cuando se alimentó nuevamente con dieta AM al día 20, Sullam *et al.* (2012) reporta en su meta-análisis que los peces herbívoros están enriquecidos con *Clostridiales*. Gatesoupe *et al.* (2013) reportó que el género *Clostridium sp.* fue promovido en heces de lubina europea *Dicentrarchus labrax* alimentada con dieta en la que sustituyó parcialmente harina de pescado por harina de lupino. Estruch *et al.* (2015) reportó a la familia *Clostridiaceae* como exclusivas en intestino de dorada *Sparus aurata* alimentadas con dieta totalmente vegetal. La presencia elevada de esta familia en peces alimentados con dieta VG podría atribuírsele a la presencia de carbohidratos no digeribles disponibles pero que no han sido digeridos mediante la acción de las enzimas digestivas endógenas del pargo flamenco, y se dispone como sustrato que influye en la composición de las comunidades bacterianas, las cuales tienden a tener parecido con la microbiota que presenta un pez herbívoro de acuerdo a lo reportado por Sullam *et al.* (2012) y Gatesoupe *et al.* (2013). Hernández *et al.* (2015) reportó para pargo flamenco coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) menor de aminoácidos en dieta a base de harina de soya que en dieta a base de harina de pescado. Los aminoácidos con menor digestibilidad son: Histidina, Leucina, Lisina, Fenilalanina, Treonina y Valina. En estudios en humanos y ratones se ha reportado que la familia *Clostridiaceae* usa como sustrato preferido los

aminoácidos Histidina, Leucina, Lisina, Treonina y Valina (Dai *et al.*, 2011), esto refuerza la idea que el exceso de aminoácidos es sustrato disponible para que se favorezcan las comunidades bacterianas al usarlo en su metabolismo.

Por otro lado, la familia *Peptostreptococcaceae* disminuyó el día 10 y aumentó significativamente para el día 20, de acuerdo al CDA de aminoácidos reportada por Hernández *et al.* (2015) para pargo flamenco, esto pudiera atribuirse a que la dieta AM proporciona una mayor disposición de los aminoácidos Serina y Fenilalanina, y estos a su vez han sido reportados como sustratos preferidos de la familia *Peptostreptococcaceae* (Dai *et al.* 2011), los cuales benefician la presencia de esta familia en el hospedero. Hartviksen *et al.* (2014) detectó esta misma familia de bacterias en la microbiota transitoria y residente de *Salmo salar* independiente del tipo de dieta suministrada, lo cual puede indicar que *Peptostreptococcaceae* es parte de la microbiota normal de peces carnívoros cuando se alimentan con dietas AM. En el mismo contexto con lo publicado por Hang *et al.* (2012), se ha encontrado esta familia en altas proporciones en las heces de perros alimentados con dieta alta en proteína animal.

Al comparar entre dietas y en las diferentes secciones del intestino analizadas para caracterizar la microbiota residente, se encontró que el intestino distal fue el más sensible al tipo de dieta. Esto coincide con lo reportado en *Salmo salar* (Hartviksen *et al.* 2014). La familia *Pseudomonadaceae* disminuyó significativamente en ésta sección del intestino, cuando se alimentó con una dieta VG. En los peces alimentados con la dieta VG se presentó mayor dominancia (índice Simpson), menor cantidad de especies observadas (riqueza) y una menor equidad. Rhodes *et al.* (2016) identificaron a la familia *Pseudomonadaceae* en todos los intestinos de *Anoplopoma fimbria*, lo cual pudiera indicar que es una familia de presencia común en el tracto intestinal de peces y que con la alimentación vegetal es una comunidad normal que se ve afectada. En el presente trabajo, el cambio con dieta VG y posteriormente volver a alimentar con dieta AM, provoca un cambio elevado a la alza en este tipo de bacterias.

En peces alimentados con la dieta AM, la familia *Vibrionaceae* se presenta en menor número de secuencias en ciegos pilóricos e intestino proximal comparado con el intestino distal y las heces, lo que se podría considerar una presencia normal de este tipo de microorganismos a lo largo del tracto intestinal, ya que es la dieta que mayormente se asemeja a su alimentación normal; sin embargo, en peces alimentados con dieta AT no se presentan diferencias significativas a lo largo del tracto intestinal ni en heces, pero si se encuentran en altas proporciones tanto en la microbiota residente como en la transitoria, lo que podría indicar que este tipo de dieta provoca que las bacterias oportunistas como lo son los *Vibrios* estén proliferando desde el inicio de la digestión, esto podría ocasionar un desequilibrio en la microbiota residente normal, ya que se ha reportado que este tipo de comunidad bacteriana prolifera mayormente en intestino distal y heces al final del proceso digestivo (Hartviksen *et al.*, 2014). En el caso de peces alimentados con la dieta VG se presentan en una mayor proporción en los ciegos pilóricos y en las heces y menor proporción en el intestino proximal y distal; lo cual nos indica que tanto la dieta AT y la dieta VG afectan la proporción normal de la presencia de esta familia. De Paula Silva *et al.* (2011) encontraron que la composición de la población bacteriana asociada a las heces de la dorada *Sparus aurata* generalmente es dominada por la familia *Vibrionaceae*; mientras que Gatesoupe *et al.* (2013) reportó que la presencia de *Vibrio* sp., se inhibe en lubina europea alimentada con una dieta en la que se sustituyó parcialmente la harina de pescado por harina de lupino, esto puede indicar que una dieta VG puede inhibir la proliferación de *Vibrios* el cual es considerado una bacteria oportunista (Lightner & Redman, 1998).

A pesar de que los índices no presentan diferencias estadísticamente significativas, en la microbiota residente existe una tendencia de los peces alimentados con dieta AM de una dominancia descendente (índice Simpson) y una equidad (índice Shannon) y riqueza (especies observadas) ascendente a través del tracto intestinal, contrario a la tendencia que se presenta en peces alimentados con dieta AT en la que se observa una dominancia creciente y equidad descendente, la riqueza es variable. Los índices de la dieta VG son

variables, con mayor dominancia en intestino proximal, mayor equidad y especies observadas en ciegos pilóricos, lo cual concuerda con los datos en los que presentó mayores diferencias significativas en número de familias cuando se realizó el análisis de componentes principales. El dendrograma que se realizó para analizar la diversidad beta concuerda con el análisis de componentes principales, en un clado se agrupan la mayoría de las muestras de la microbiota residente y en otro a la mayoría de las muestras de la microbiota transitoria, con datos extremos para algunas muestras de microbiota residente de peces alimentados principalmente con dieta AT y VG, no se observa un agrupamiento claro de las muestras dependiendo de la dieta suministrada; sin embargo algunas muestras tanto de microbiota transitoria como de residente de peces alimentados con dieta VG tienden a mantenerse agrupadas, lo cual refuerza la evidencia de que la dieta VG es la que ocasiona un mayor efecto significativo.

En general, la dieta VG es la que provocó mayores cambios tanto en la composición de la comunidad bacteriana como en los índices de diversidad, al igual que lo que sucede en los estudios que se han realizado de evaluaciones de crecimiento y salud de *L. guttatus*, las fuentes de proteína vegetal a inclusiones mayores al 35% también provocan cambios significativos en los parámetros biológicos de crecimiento, disminuye el hematocrito, hemoglobina, y el índice de eficiencia proteica (Hernández *et al.*, 2015), lo cual indica que es necesario que este tipo de proteína se combine con aquellas que han demostrado mayores niveles de digestibilidad y perfil de aminoácidos como lo son las harinas animal terrestre, para que así puedan complementar los beneficios a la salud de los peces carnívoros.

Independientemente de la dieta suministrada, un hallazgo importante es que los resultados indican que la composición de la microbiota transitoria es significativamente diferente que la residente, con una riqueza aparente mayor en las heces que en la microbiota residente, esto concuerda con estudios en *Gadus morhua* (Ringo *et al.*, 2006) y *L. argentimaculatus* (Feng *et al.*, 2011). Kim *et al.*

(2007) establecen que esta diferencia puede deberse a las diferencias de condiciones ambientales entre el contenido intestinal y la superficie de la mucosa en peces, el contenido intestinal podría ser un ambiente favorable para que se desarrollen más especies de bacterias, además que la composición de la microbiota también depende de la composición microbioana del agua de cultivo (Nayak, 2010)

En este trabajo los phyla que se presentaron en una proporción mayor al 1% son *Proteobacteria* (> 90%), *Fusobacteria*, *Firmicutes* y *Cyanobacteria*; tanto para la microbiota transitoria como la residente el phylum dominante es el *Proteobacteria*, esto concuerda con lo reportado en otras especies como *L. campechanus* (Tarnecki *et al.*, 2016), *Anoplopoma fimbria* (Rhodes *et al.*, 2016), *Scophthalmus maximus* (Xing *et al.*, 2013), *L. argentimaculatus* (Feng *et al.*, 2011). La presencia de *Proteobacteria* en altas proporciones se atribuye a que el agua de mar representa una fuente considerable de este phyla para los peces a través de su consumo (Sullam *et al.*, 2012).

La composición de la microbiota encontrada en el presente trabajo, concuerda con lo reportado por Givens *et al.* (2015) en su estudio encontraron que para 12 especies de peces la riqueza se encuentra en un rango de 2 a 6 phyla (>1%) con una dominancia de los phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Tenericutes* y *Planctomycetes*.

En el caso de bacterias heterótrofas totales, los valores concuerdan con lo reportado para otras especies, independientemente de la dieta suministrada, los valores se encuentran dentro de los rangos reportados. Las poblaciones de bacterias heterótrofas en el tracto digestivo se estiman en el orden de  $\sim 10^8$  UFC  $g^{-1}$  (Austin, 2006), en *Lutjanus campechanus* silvestre (Tarnecki *et al.* 2016), bacalao del atlántico *Gadus morhua* (Ringo *et al.* 2006), y *Lutjanus bohar* (Smriga *et al.* 2010) se han reportado valores similares a los obtenidos en este trabajo, al igual que en el estudio metagenómico, en el conteo de bacterias viables en las heces de peces alimentados con dieta VG fue el que presentó diferencias significativas menor.

Finalmente, los resultados de este trabajo, indican que los grupos de bacterias dominantes de la microbiota transitoria y residente no se ven afectados por el tipo de dieta, lo que concuerda con lo establecido por Hartviksen *et al.* (2014) para el *Salmo salar*. Solo se encontraron algunas variaciones en proporción de presencia de *Gammaproteobacterias* y algunas familias como las *Vibrionaceae*, *Enterobactereaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae* que pudiera considerarse que son las más sensibles a los cambios de fuente de proteína en la dieta. La poca variación que presenta la microbiota tanto residente como transitoria pudiera deberse a dos factores principalmente. Primeramente a que el sistema inmune de los peces lograron regular una posible disbiosis en la composición de la comunidad bacteriana, es posible que el buen balance de aminoácidos en la dieta animal terrestre le permita al pez mantener sus barreras epiteliales (mucus), así como también sus mecanismos de defensa celular y humoral (Gomez & Balcazar, 2008). Y por otro lado a la falta de tiempo de exposición a las dietas experimentales, ya que se observan ligeras tendencias sin haber logrado los cambios significativos que se esperaba.



## IX. CONCLUSIONES

1. La microbiota residente presente en los ciegos pilóricos, el intestino proximal e intestino distal es diferente a la transitoria evaluada en las heces del pargo flamenco alimentado con diferentes dietas (Animal Marino, Animal Terrestre y Vegetal). La familia *Enterobacteriaceae* es la más abundante para la microbiota residente y las *Gammaproteobacterias* no clasificadas en conjunto con la familia *Vibrionaceae* son las más abundantes en la microbiota transitoria.
2. A pesar que son los mismos tratamientos, la microbiota cambia de individuo a individuo. El cambio de dieta a dieta genera composición de microbiota distinta y no necesariamente regresa a su estado inicial.
3. La dieta animal terrestre presentó tendencia de índices de diversidad alfa contrarios a los que se presentaron en dieta animal marino a lo largo del tracto intestinal. La dieta vegetal presentó mayores diferencias significativas en la presencia de bacterias entre las distintas secciones del tracto intestinal y heces, así como en los índices de diversidad.
4. El intestino distal es la sección del tracto intestinal del pargo flamenco que presenta mayor sensibilidad al tipo de dieta suministrada.
5. La estimación de bacterias heterótrofas totales en microbiota transitoria fue similar a lo reportado en otros estudios para peces carnívoros.

## X. RECOMENDACIONES

- A la par que se investigan nuevas fuentes de proteína, se recomienda el análisis de los cambios en la composición de las comunidades bacterianas y mayor investigación sobre el tema de la microbiota a nivel metagenómica funcional. Esto para describir una posible contribución de la microbiota a la digestión endógena en peces, y también lograr que se mantenga la salud digestiva de los organismos de interés.
- Realizar sustituciones parciales de proteína vegetal a la dieta animal terrestre como una opción de uso de fuentes de proteína alternativa y evaluar la composición de microbiota para conservar la salud del pez.
- Evaluar por mayor tiempo la estructura de la comunidad bacteriana, con la finalidad de que se generen diferencias significativas entre tratamientos.
- Integrar estudios histológicos y sanguíneos para identificar posibles reacciones del sistema inmune a la composición de la microbiota intestinal dependiendo de la dieta.
- Generar mayor conocimiento de la interacción microbiota y hospedero que ayude a mejorar las formas de alimentación de los organismos acuáticos con potencial económico y de cultivo.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Acinas, S. G. (2007) Diversidad y estructura de una comunidad microbiana. Actualidad SEM-Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología, 44, 24-9.
- Alvarez-Lajonchere, L., Ibarra-Castro L., García-Aguilar, N., Velasco-Blanco, B., Puello-Cruz, A., González-Rodríguez, B., Abdo de la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, L.E., García-Ortega, A., Fajer-Avila E., & Medina-Guerrero, R.M. (2011) El Pargo Flamenco: *Lutjanus guttatus*. CIAD-AM Editores. México. Pp. 169
- Austreng, E. (1978) Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of different segments of the gastrointestinal tract. Aquaculture 13, 265–272.
- Balcazar J.L., Decamp O., Vendrell D., de Blas I. & Ruiz-Zarzuela I. (2006) Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. Microb Ecol Health Dis 18: 65–70.
- Belchior, S.G.E. & Vacca, G. (2006) Fish protein hydrolysis by a psychrotrophic marine bacterium isolated from the gut of hake (*Merluccius hubbsi*). Can. J. Microbiol. 52: 1266–1271.
- Benítez-Hernández, A. (2013) Evaluación de diferentes proporciones de proteína y carbohidratos sobre la respuesta fisiológica y metabólica de juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Tesis de Maestría CIAD Mazatlán, México. Pp. 68
- Boza-Abarca J., Calvo-Vargas E., Solis-Ortiz N. & Komen J. (2008) Desove inducido y crecimiento larval de pargo manchado, *Lutjanus guttatus*, en la Estación de Biología Marina de Puntarenas, Costa Rica. Ciencias Marinas, vol. 34, pp 239-252
- Camacho, A., Giles M., OrtegónA., PalaoM., Serrano B. & Velázquez O. (2009) Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México 25(23), 10-3.

- Clements, K.D., Angert, E.R., Montgomery, W.L., & Choat, J.H. (2014) Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not. *Molecular Ecology* 23: 1891–1898.
- Corrales, L. C., Romero, D. M. A., Macías, J. A. B., & Vargas, A. M. C. (2015) Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*, 13(24), 55-82.
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260-270.
- Dai, Z. L., Wu, G., & Zhu, W. Y. (2011). Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Front Biosci*, 16(1), 1768-1786.
- Delgado-Palacio, S. (2005) Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. Tesis de Doctorado. Universidad de Oviedo. Departamento de Biología funcional. 162 pp.
- 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.
- Escalante, A. E. (2008) Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. *Ecología molecular*, X. Aguirre, V. Souza and LE Eguarte (eds.). Conabio, INE. Ciudad de México, 393-424.
- Escobar, 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 Acuícola, 15-17 de Noviembre. 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., & Martínez-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*, 10(8), e0136389.
- FAO. (2016) El estado mundial de la pesca y la cuicultura Consultado el 27/Noviembre/2016.

- Feng, J. B., Luo, P., Dong, J. D., & Hu, C. Q. (2011) Intestinal microbiota of mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus* Forsskål, 1775) reared in sea cages. *Aquaculture Research*, 42(11), 1703-1713.
- Gatesoupe, F. J., Huelvan, C., Le-Bayon, N., Sévere, A., Aasen, I.M., Degnes, K.F., Mazurais, D., Panserat, S., Zambonino-Infante, J.L. & Kaushik, S.J. (2013) The effects of dietary carbohydrate sources and forms on metabolic response and intestinal microbioma in sea bass juveniles, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* Vol. 422:47-53.
- Ghosh, K., Roy, M., Kar, N. & Ringo, E. (2010) Gastrointestinal bacteria in rohu, *Labeo rohita* (*Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae*): scanning electron microscopy and bacteriological study. *Acta Ichthyol Piscatoria*, 40, 129–135.
- Givens, C. E., Ransom, B., Bano, N., & Hollibaugh, J. T. (2015) Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series*, 518, 209-223.
- Glencross, B. (2011) A comparison of the digestibility of diets and ingredients fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) or barramundi (*Lates calcarifer*)—the potential for inference of digestibility values among species. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), e207-e215.
- Gómez, G. D., & Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2), 145-154.
- Grosell, M., Farrel, A.P. & Brauner, C.J. (2011) The multifunctional gut of Fish. *Fish Physiology*. USA: Academic Press, Elsevier Vol. 30 pp. 460.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. & Métailler, R. (2004) Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Barcelona: Mundi-Prensa.No. 04; SH156, N8.).
- Gullon, B., Pintado, M. E., Barber, X., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2015) Bioaccessibility, changes in the antioxidant potential and colonic fermentation of date pits and apple bagasse flours obtained from co-products during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 78, 169-176.

- Handelsman, J., Tiedje, J., Alvarez-Cohen, L., Ashburner, M., Cann, I. K. O., Delong, E. F., & Riley, M. (2007). The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet. *Nat Res Council Report*, 13, 47-84.
- Hang, I., Rinttila, T., Zentek, J., Kettunen, A., Alaja, S., Apajalahti, J., & Spillmann, T. (2012) Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota. *BMC veterinary research*, 8(1), 1.
- Hartviksen, M., Vecino, J.L.G., Ringø, E., Bakke, A.M., Wadsworth, S., Kroghdahl, Å., Ruuhonen, K. & Kettunen, A. (2014) Alternative dietary protein sources for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) effect on intestinal microbiota, intestinal and liver histology and growth. *Aquaculture Nutrition*, 20: 381–398.
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., & von Wright, A. (2006) Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261(1), 259-268.
- Hernández-Maldonado, L.M. (2013) Caracterización de proteasas ácidas y alcalinas en el tracto digestivo de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mazatlán. Pp. 65.
- Hernández, C., Hardy, R.W., Márquez-Martínez, D.G., Domínguez-Jiménez, P.V., & González-Rodríguez, B. (2015) Evaluation of apparent digestibility coefficients of individual feed ingredients in spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachmer, 1869). *Aquaculture nutrition*, 21(6), 835-842.
- Hernández, C.H, Hernández, C., Martínez, C.F., Castañeda-Lomas, N., Rodríguez-Domínguez G., Tacon, A. & Aragón-Noriega, E. (2016) Effect of density at harvest on the growth performance and profitability of hatchery-reared spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*, cultured in floating net cages. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(1), 51-60.
- Ibarra-Castro, L. & Alvarez-Lajonchere, L. (2011) GnRH $\alpha$  induced multiple spawns and voluntary spawning of captive spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) at Mazatlan, Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 564–574.
- Jobling, M. (2015) Fish nutrition research: past, present and future. *Aquaculture International* 1-20

- Kar, N. & Ghosh, K. (2008) Enzyme producing bacteria in the gastrointestinal tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). Turkish J. Fish. Aqua. Sci., 8, 115–120.
- Kim D.H., Brunt J. & Austin B. (2007) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Microbiology 102, 1654-1664.
- Koenen, M. E., Rubio, J. M. C., Mueller, M., & Venema, K. (2016) The effect of agave fructan products on the activity and composition of the microbiota determined in a dynamic *in vitro* model of the human proximal large intestine. Journal of Functional Foods, 22, 201-210.
- Lightner, D. V. & Redman, R. M. (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164, 201–220.
- Li, P., Yin, Y. L., Li, D., Kim, S. W., & Wu, G. (2007) Amino acids and immune function. British Journal of Nutrition, 98(02), 237-252.
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S.H., & Derome, N. (2014). Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. Frontiers in Microbiology Vol. 5 Art. 207.
- Mondal, S., Roy, T., and Ray, A.K. (2010) Characterization and identification of enzyme-producing bacteria isolated from the digestive tract of bata, *Labeo bata*. Journal of the World Aquaculture Society, 41:369–376.
- Moreno, C. E. (2001) Métodos para medir la biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol.1. Zaragoza, 84 pp.
- Morita, Y., Hasan, Q., Sakaguchi, T., Murakami, Y., Yokoyama, K. & Tamiya, E. (1998) Properties of a cold-active protease from psychrotrophic *Flavobacterium balustinum* P104. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50:669–675.
- Moyle, P.B. & Coch, J. (2000) Fishes: An Introduction to Ichthyology. Fourth Edition. Prentice Hall, Inc. USA. Pp. 612.
- Nayak SK (2010) Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research, 41, 1553–1573.

- Nicholson, J.K., Gibson, G., Holmes, E., Jia, W., Pettersson, S., Kinross, J. & Burcelin, R. (2012) Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science* 336:1262-1267.
- Norzagaray, M., Muñoz, P., Sánchez-Velasco, L., Capurro-Filograsso, L., & Llánes-Cárdenas, O. (2012) Acuacultura: estado actual y retos de la investigación en México. *Revista AquaTic* 37:20-25.
- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Xiao, J. Z., Abe, F., & Benno, Y. (2016) Effect of probiotic yoghurt on animal-based diet-induced change in gut microbiota: an open, randomised, parallel-group study. *Beneficial microbes*, 1-12.
- 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.
- Pedrotti, F. S., Davies, S., Merrifield, D.L., Marques, M. R., Fragas, A.P., Mouriño, J.L., & Fracalossi, D. (2015) The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundia (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research* 46:472–481
- Peña E., Hernández C., Álvarez-González C.A., Ibarra-Castro L., Puello-Cruz A. & Hardy R.W. (2015) Comparative characterization of protease activity in cultured spotted rose snapper juveniles (*Lutjanus guttatus*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(4), 641.
- Quinn, G. P. & Keough, M.J. (2002) *Experimental design and data analysis for biologists*, Cambridge University Press.
- Ray, A.K., Roy, T., Mondal, S., & Ringø, E. (2010) Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. *Aquaculture Research*., 41:1462–1469.
- Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringø, E. (2012) Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5):465-492.
- Reddy, C. A., Beveridge, T. J., Breznak, J. A., Marzluf, G., Schmidt, T.M. & Snyder L.R. (Eds.). (2009) *Methods for general and molecular microbiology*. American Society for Microbiology Press. 3rd Ed. Washington, DC. 1069 pp.

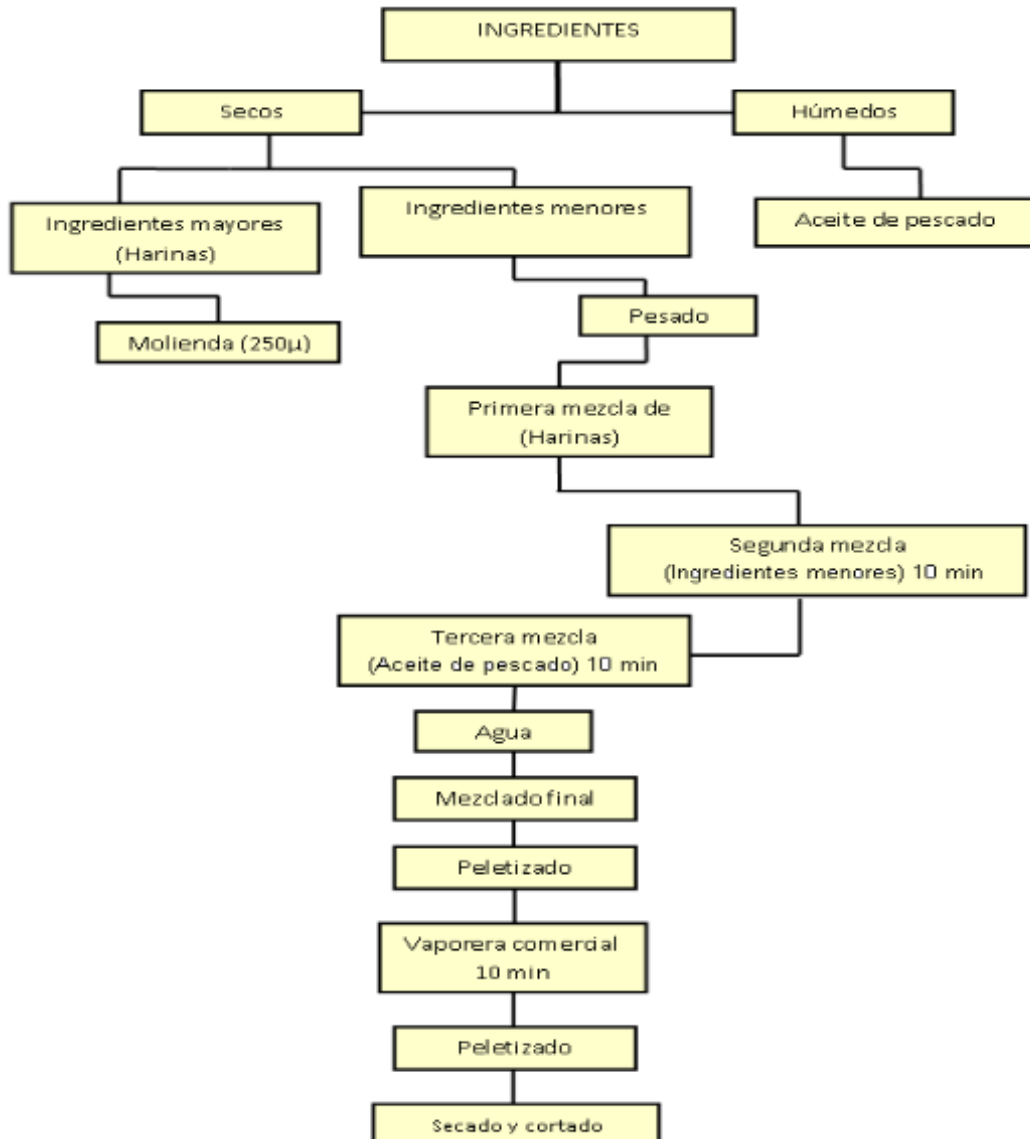


- Řehulka, J., Minařík, B., Cink, D., & Žalák, J. (2014). Prebiotic effect of fructo-oligosaccharides on growth and physiological state of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 59(5), 227-236.
- Rhodes, L. D., Johnson, R. B., & Myers, M. S. (2016) Effects of alternative plant-based feeds on hepatic and gastrointestinal histology and the gastrointestinal microbiome of sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Aquaculture*.
- Ringo, E. Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S., & Krogdahl, Å. (2006) Characterization of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 261(3):829-841.
- Ringo, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., & Owen, M. (2015) Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?. *Aquaculture Nutrition* 22: 219-282.
- Sánchez-Gutiérrez, E. J. (2013) Evaluación de la suplementación de taurina en dietas a base de harina de soya y su efecto en el metabolismo del pargo colorado *Lutjanus Colorado* (Jordan y Gilbert, 1882). Tesis de Maestría. CIAD Mazatlán. Pp. 79.
- 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. Pp. 59.
- Shen, W., Gaskins, H.R., Michael, K., & Mcintosh, M.K. (2014) Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25:270–280.
- Skrodenyte-Arbaciauskiene, V. (2000). Proteolytic activity of the roach (*Rutilus rutilus* L.) intestinal microflora. *Acta Zool. Lit.* 10:69–77.
- Smriga, S., Sandin, S.A. & Azam, F. (2010). Abundance, diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces. *FEMS Microbiology Ecology* 73:31–42.

- Soto, S.A. (2002) Estudio de los mecanismos de patogenicidad de bacterias luminiscentes en larvas de camarón. Tesis de Doctorado. CICESE. Ensenada, Baja California. Pp. 272.
- Sullam, K. E., Essinger, S. D., Lozupone, C. A., O'CONNOR, M. P., Rosen, G. L., Knight, R. O. B., Kilham, S.S., & Russell, J. A. (2012) Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular ecology*, 21(13), 3363-3378.
- Tarnecki, A. M., Patterson, W. F., & Arias, C. R. (2016) Microbiota of wild-caught Red Snapper *Lutjanus campechanus*. *BMC Microbiology*, 16(1), 245.
- Xing, M., Hou, Z., Yuan, J., Liu, Y., Qu, Y., & Liu, B. (2013) Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*). *FEMS Microbiology Ecology*, 86(3), 432-443.
- Zar, J.H. (1999) *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 929 p.p.

## XII. ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de elaboración de dietas experimentales (Hernández *et al.*, 2010)



## ANEXO 2. Barcodes utilizados para marcar las muestras que se secuenciaron.

Nombre del primer forward	Secuencia (5´- 3´)
IonXpress_01_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>CTAAGGTAA</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_03_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>AAGAGGATTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_04_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TACCAAGATC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_05_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>CAGAAGGAAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_06_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>CTGCAAGTTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_07_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTCGTGATTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_08_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTCCGATAAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_09_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TGAGCGGAAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_10_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>CTGACCGAAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_11_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCCTCGAATC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_12_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TAGGTGGTTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_13_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCTAACGGAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_14_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTGGAGTGTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_15_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCTAGAGGTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_16_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCTGGATGAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_17_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCTATTCGTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_18_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>AGGCAATTG</b> CgatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_19_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTAGTCGGAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_21_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCGCAATTAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_22_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTCGAGACGC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_24_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>AACCTCATTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_26_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTACAACCTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_31_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCCAAGCTGC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_32_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCTTACACAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_33_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTCTCATTGAAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_37_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>CTTGAGAATGTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_38_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TGGAGGACGGAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_39_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TAACAATCGGC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_41_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTCCACTTCGC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_43_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>CTTGACACCGC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_45_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TGGAGCTTCCTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_47_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TAAGGCAACCAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_48_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTCTAAGAGAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_49_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCCTAACATAAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_50_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>CGGACAATGGC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_58_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCCTAGAACAC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_60_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCTAGCTCTTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_63_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>CCTTAGAGTTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_65_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TCCTGGCACATC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_66_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>CCGCAATCATC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_67_V3f	ccatctcatccctgcggtgtctccgactcag <b>TTCTACCAGTC</b> gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG

IonXpress\_70\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CCTACTGGTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_71\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**TGAGGCTCCGAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_72\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CGAAGGCCACAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_75\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**TCAGGAATAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_76\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CGGAAGAACCCTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_77\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CGAAGCGATTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_79\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CCTGGTTGTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_82\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**TGGCATCTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_83\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CTAGGACATTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_85\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CCAGCCTCAAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_86\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CTTGGTTATTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_87\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**TGGCTGGAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_89\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**TCCTGAATCTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_90\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CTAACCACGGC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_92\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CTAGGAACCGC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_94\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**TCCGACAAGC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_95\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**CGGACAGATC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
IonXpress\_96\_V3f ccatctcatccctgcgtgtctccgactcag**TTAAGCGGTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
16S-V3\_533r CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTACCGCGCTGCTGGCAC

---