



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Efecto en la composición de la microbiota del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) alimentado con dietas suplementadas con agavina en condiciones reales de cultivo”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA

ING. JUAN PABLO OCHOA ROMO

TUTOR PRINCIPAL

DR. ADRIÁN OCHOA LEYVA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

Cuernavaca Morelos, Marzo, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

## JURADO

Dr. José Luis Puente García (MM-IBt-UNAM) - Presidente

Dra. Blanca Itzel Taboada Ramírez (GDFM-IBt-UNAM) - Secretario

Dra. Esperanza Martínez Romero (CCG-UNAM)

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos (MM-IBt-UNAM)

Dr. Rafael Peña Miller (CCG-UNAM)

---

---

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 22, fungiendo como tutor, el Dr. Adrián Ochoa Leyva, del Departamento de Microbiología Molecular, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El proyecto fue financiado por los donativos de DGAPA PAPPIT UNAM (IA203118, IN215520).

---

## **Agradecimientos**

En primer lugar, a mis padres, con quienes siempre estaré profundamente agradecido, por su apoyo incondicional, por su admirable paciencia y por su infinito amor. Todo lo que he logrado no sería posible sin Ellos, y son precisamente Ellos son una de mis principales motivaciones que me animan a seguir adelante.

Al Dr. Adrián Ochoa Leyva, por aceptarme en su laboratorio y equipo de trabajo. Por fungir como tutor de quien esto escribe, durante todo el desarrollo del presente trabajo, así como por guiarme diligentemente a cada paso que he comenzado a dar en el fascinante mundo del quehacer científico.

A los doctores: Agustín López Munguía y Luis David Alcaraz Peraza, quienes fueron parte de mi comité tutorial. Gracias por sus atinados y enriquecedores comentarios; los cuales, enriquecieron este trabajo de manera invaluable.

A mis compañeros de Microbiomics en el Laboratorio 22, como a aquellos que he conocido durante mi estancia en el Instituto, cada uno de ellos ha sido testigo de mi formación y del esfuerzo que ha implicado realizar este trabajo. Gracias, por permitirme ser, a su vez, testigo de su propio crecimiento, del esfuerzo y dedicación de cada uno de ellos.

Siempre tendrán un lugar especial en mi memoria.

## Resumen

El camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), en términos de valor económico, es una de las especies más importantes para la acuicultura a nivel mundial, y representa en México la especie más importante en ese contexto. La demanda de *L. vannamei* ha experimentado un incremento a nivel mundial año con año; aunado a esto, los productores enfrentan graves retos, que en ocasiones implican pérdidas de hasta la totalidad de la producción debido a distintas enfermedades que impactan la acuicultura de *L. vannamei*. Estos retos han llevado al desarrollo de prácticas que permitan obtener un mayor rendimiento de la producción, o la obtención de camarones más resistentes a enfermedades entre otras. Una de estas prácticas involucra el uso de prebióticos que impacten de manera positiva en el camarón mediante la modulación de la comunidad microbiana en su tracto digestivo. La agavina es un polisacárido ramificado compuesto en su mayoría de fructanos y que se encuentra en distintas variedades de agave, en los cuales, tiene la función de ser un carbohidrato de reserva. En este trabajo se contaron con tres grupos experimentales, cada uno de ellos compuesto por 20 camarones. Cada grupo se mantuvo en una jaula bajo condiciones reales de cultivo en una granja de producción de camarón. A cada grupo se le suministró una de las tres dietas experimentales evaluadas: dieta basal, dieta suplementada con agavina al 2 %, y dieta suplementada con agavina al 10 %. Cada grupo experimental fue por triplicado, para un total de 9 jaulas. Se evaluó el impacto de la agavina, tanto en el rendimiento, como en la comunidad microbiana del hepatopáncreas y del intestino de *L. vannamei*, dos de los órganos más importantes implicados en la digestión y absorción de nutrientes. Esto mediante secuenciación de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S del rARN, lo que reveló que la agavina impacta en la composición de la microbiota de manera dependiente de la concentración y que el impacto también es órgano-dependiente. Los grupos alimentados, con la dieta suplementada con agavina al 10%, mostraron tener una mayor abundancia/presencia de bacterias probióticas, sin embargo, en la cuestión de la tasa de conversión alimenticia, el grupo de camarones alimentados con la dieta suplementada con agavina al 2 % fue mejor. Esto revela que la agavina es capaz

de modular la microbiota del camarón blanco del Pacífico e impacta en su crecimiento; además, tanto la concentración del prebiótico, como el efecto órgano-dependiente son factores importantes a tomar en cuenta a la hora de elegir una estrategia que involucre implementar el uso de agavina como prebiótico.

## Índice general

1. Introducción	5
1.1 Microbiota de camarón	5
1.1.2 Microbiota de <i>L. vannamei</i>	6
1.1.4 Estructura del tracto digestivo en camarón	9
1.1.4.1 Hepatopáncreas estructura y función en la digestión e inmunidad del camarón	11
1.1.4.2 Intestino: morfología y función	13
1.1.4.3 La microbiota en el hepatopancreas e intestino	14
1.1.5 Microbiota y estados patológicos en <i>L. vannamei</i>	16
1.2 Moduladores de la microbiota en <i>L. vannamei</i>	19
1.3 Ácidos grasos de cadena corta y su efecto <i>L. vannamei</i> y en su microbiota	20
1.4 Los polisacáridos modulan la microbiota del tracto digestivo de <i>L. vannamei</i>	21
1.5 Fructooligosacáridos e Inulina: impacto en la microbiota del tracto digestivo de <i>L. vannamei</i>	23
2 Hipótesis	28
3 Objetivos	28
3.1 General	28
3.2 Específicos	28
4. Procedimiento	29
4.1 Bioensayo	29
4.3 Toma de muestras	32
4.4 Extracción amplificación y secuenciación del DNA	32
4.5 Pre-procesamiento de las secuencias	33
4.6 Generando la tabla <i>BIOM</i>	34
4.8 Análisis de diversidad $\alpha$ y $\beta$	35
4.9 Análisis de presencia y abundancia de probióticos	36
5. Resultados	38
5.1 Resultados de los parámetros físico-químicos	38
5.2 Evaluación del rendimiento en el crecimiento del <i>L. vannamei</i>	38
5.3 Análisis de las secuencias	39
5.4 Construcción de la tabla <i>BIOM</i>	40
5.5 Diversidad alfa en tratamientos	43
5.6 Diversidad alfa en los hepatopáncreas	46
5.7 Diversidad alfa en intestinos	48
5.8 Análisis de la diversidad beta	50
5.9 Diversidad beta en los hepatopancreas e intestinos	52



5.10 La adición de agavina tiene un impacto en la composición de la microbiota	54
5.11 La agavina tiene impacto en la composición de los grupos diferenciales en los hepatopáncreas	61
5.13 Análisis de la presencia de prebióticos	72
6. Discusión y conclusiones	77
6.1 La agavina como promotor de crecimiento en <i>L.vannamei</i>	77
6.2 El impacto de la agavina sobre la microbiota en hepatopáncreas e intestino de <i>L. vannamei</i>	78
Referencias	88
Anexos	107
Anexo 1. Análisis de diversidad beta que incluye la muestra 10.3H4. A) <i>UniFrac unweighted</i> . B) <i>UniFrac weighted</i>	107
Anexo 2. Profundidad de cada una de las librerías que entraron al análisis y el número de lecturas que pasan cada uno de los procesos de filtrado de calidad	109
Anexo 3. Resultados de la diversidad alfa generados con la tabla BIOM con profundidad homologada	112
Anexo 4. Diversidad beta. Resultados calculados a partir de la tabla BIOM con profundidad homologada	113
Anexo 4.1. Los PCoA representan el análisis <i>UniFrac unweighted</i> (arriba) y <i>weighted</i> (abajo) de todas las muestras, identificadas por órgano	113
Anexo 4.2. Los PCoA representan el análisis <i>UniFrac unweighted</i> (arriba) y <i>weighted</i> (abajo) de todas las muestras identificadas por dieta experimental	114
Anexo 4.3. Los PCoA representan el análisis <i>UniFrac unweighted</i> (arriba) y <i>weighted</i> (abajo) de los hepatopáncreas identificados por dieta experimental	115
Anexo 4.4. Los PCoA representan el análisis <i>UniFrac unweighted</i> (arriba) y <i>weighted</i> (abajo) de los intestinos identificados por dieta experimental	116
Anexo 5. Grupos diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de <i>LEfSe</i> a nivel de especie incluyendo aquellas no designadas	117
Anexo 5.1 Especies diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de <i>LEfSe</i> en los hepatopáncreas de los diferentes grupos: Arriba) DB vs A2. Abajo) DB vs A10	117
Anexo 5.2 Especies diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de <i>LEfSe</i> en los intestinos de los diferentes grupos: Arriba) DB vs A2. Abajo) DB vs A10	123
Anexo 5.3 Especies diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de <i>LEfSe</i> de los diferentes grupos: Arriba) Hepatopáncreas A2 vs A10. Abajo) Intestinos A2 vs A10	125
Anexo 6. Especies probióticas y su presencia, tanto en Silva132 como en Green genes 13.8, así como aquellas especies que se logran asignar en cada una de las bases de datos.	133

## 1. Introducción

### 1.1 Microbiota de camarón

La diversidad de microorganismos que habitan el tracto digestivo, o microbiota, tienen un efecto profundo en la fisiología del hospedero, en aspectos como el metabolismo de nutrientes, la resistencia a infecciones y el desarrollo del sistema inmune (Wall *et al*, 2009; Clarke *et al*, 2014; Mueller *et al*, 2015). En humanos, actualmente, se considera que la microbiota del tracto digestivo tiene un rol crítico incluso en el desarrollo y diversas funciones del sistema nervioso central, lo que hoy conocemos como el eje microbiota-intestino-cerebro (Fung *et al*, 2017).

En camarones, los factores ambientales del agua y sedimentos, juegan un rol clave en la microbiota del tracto digestivo del camarón ya que, a comparación con los mamíferos, en los decápodos, como los camarones, langostas o cangrejos, el tracto digestivo es inicialmente poblado por la microbiota de su ambiente (Zhang *et al*, 2017; Feinman *et al*, 2017). Cornejo-Granados *et al*, (2018) describieron, en un meta-análisis que contempló 199 muestras de 16 estudios, los distintos factores que contribuyen a dar forma a la microbiota de *Litopenaeus vannamei*, *Alvinocaris longirostris*, *Penaeus monodon*, *Macrobrachium nipponense*, *Macrobrachium asperulum*, *Neocardina denticulata* y *Macrobrachium rosenbergii*. Se reportó que la salinidad del agua es el factor que más impacta sobre la microbiota (Figura 1).

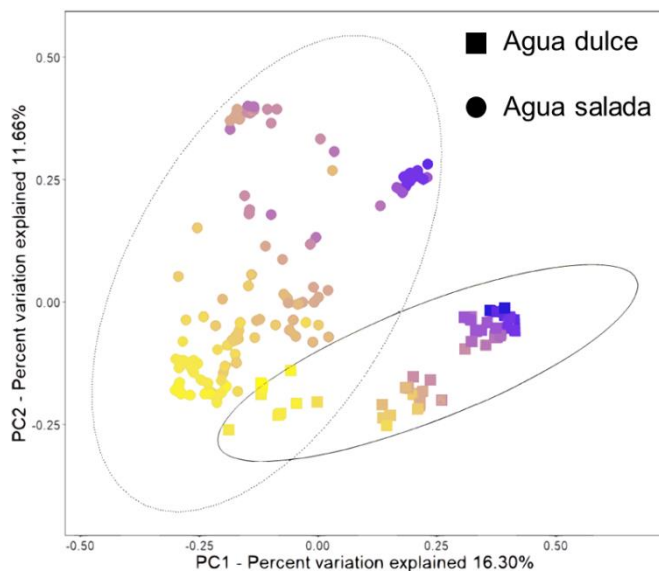


Figura 1. PCoA que representa el análisis de diversidad beta Unweighted Unifrac que muestra la diferencia entre las comunidades microbianas en camarones de agua salada y agua dulce. Modificado de Cornejo-Granados *et al*, 2018

Las muestras de camarones de agua marina (*L. vannamei*, *A. longirostris*, *P. monodon*) se caracterizaron porque a nivel de fila, su microbiota estaba dominada por *Proteobacteria*, a diferencia de las muestras de camarones de agua fresca; además, las muestras de agua marina presentaron una mayor abundancia de *Tenericutes* y *Fusobacteria*. En contraste, las muestras de camarones de agua dulce (*M. nipponense*, *M. asperulum*, *N. denticulata*, *M. rosenbergii*), presentaron una mayor abundancia de *Firmicutes*. A nivel de familia, *Rhodobacteraceae*, *Vibrionaceae*, *Helicobacteraceae* y *Pseudoalteromonadaceae*, fueron más abundantes en camarones de agua marinas, mientras *Oxalobacteraceae*, *Comamonadaceae* y *Bacillaceae*, estuvieron más enriquecidas en camarones de agua dulce. Además, éstas últimas mostraron tener una mayor diversidad bacteriana que los camarones de agua salada, esto concuerda con diversos estudios que reportan una mayor diversidad y riqueza en cuerpos de agua fresca, con respecto al agua marina (Wang *et al*, 2012; Lee & Eom, 2016; Balmonte *et al*, 2020), lo que deja de manifiesto la importancia de los factores ambientales en la microbiota del camarón.

### **1.1.2 Microbiota de *L. vannamei***

*L. vannamei* y *P. monodon*, representan cerca del 86 % de la producción de camarón cultivadas a nivel mundial, siendo las especies más importantes en términos de valor económico (Gillett, 2008). Ambas, son consideradas especies de agua salada, es por lo tanto, común que ambas especies tengan una microbiota intestinal dominada por los grupos taxonómicos similares a nivel de fila. Rungransamee *et al*, (2014) encontró que en el tracto digestivo de *P. monodon*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, y *Actinobacteria* son las filas dominantes, tanto *Wild Type* (Wt), como en acuicultura, difiriendo en la abundancia de algunos de éstas filas bajo diferentes condiciones. Mientras que Cornejo-Granados *et al*, (2017) describieron que las filas más abundantes en el tracto digestivo de *L. vannamei*, tanto en *Wt* como en camarones de acuicultura son: *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*. Ambos estudios mostraron que el camarón en ambiente silvestre presenta una microbiota distinta al cultivado.

El camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*), por su valor comercial es la más importante a nivel nacional. Hacia el año de 2017, México se ubicó en el 7° lugar en la producción de esta especie, con una producción de 227,929 toneladas, y un crecimiento anual medio de 1.67% en los últimos 10 años (Figura 2) (CONAPESCA, 2017 & 2018).

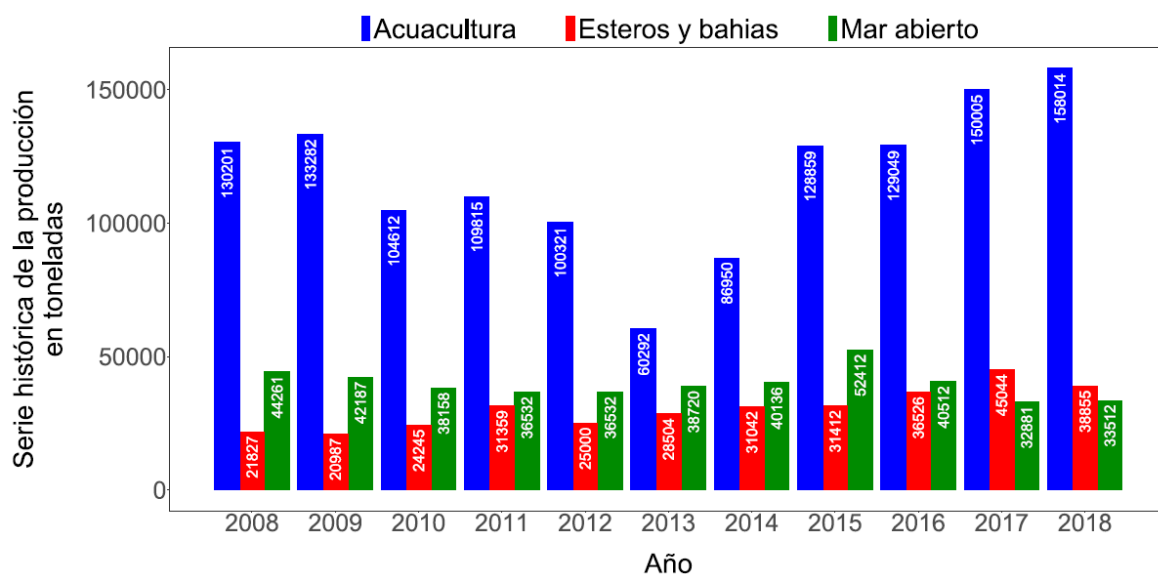


Figura 2. Serie histórica de la producción de *L. vannamei* de anual, por método de producción (CONAPESCA., 2017)

### 1.1.3 Factores biológicos tienen un impacto en la microbiota en *L. vannamei*

La composición de la microbiota en *L. vannamei* depende, en primer lugar, de factores ambientales como la salinidad del agua, pero también de factores como la dieta, y aspectos biológicos que involucran al hospedero, como pueden ser los órganos, el estado de desarrollo, etc. (Rungrassamee *et al*, 2014; Cheung *et al*, 2015; Cornejo-Granados *et al*, 2017 & 2018; García-López *et al*, 2020). (Figura 3).

Cornejo-Granados *et al*, (2018), mediante un meta-análisis que contempló 199 muestras de 16 estudios analizaron el efecto que factores como el entorno, órgano o etapa de desarrollo tienen en la microbiota, encontrando que el entorno tiene el máximo impacto en la estructura y función de la microbiota, seguido por el

órgano y, por último, la etapa de desarrollo (Figura 4). Interesantemente, encontraron que, entre camarones con la misma etapa de desarrollo, hay una microbiota órgano-dependiente, la cual varía en función del estado de desarrollo del camarón. Siendo dos de los órganos más importantes para la nutrición del camarón el hepatopáncreas e intestino.

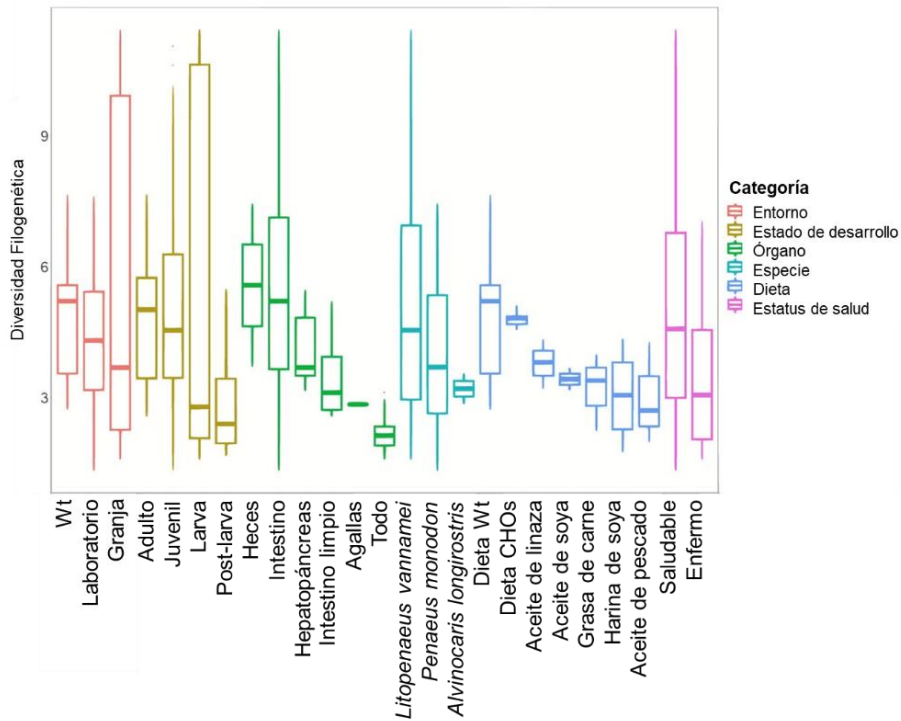


Figura 4. Los boxplots indican el índice la diversidad filogenética para las distintas categorías que tiene un impacto en la microbiota de camarones de agua salada. Modificado de Cornejo-Granados et al, 2018

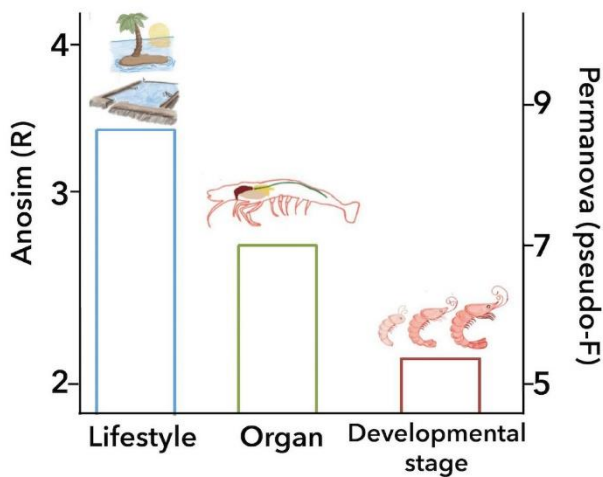


Figura 3. Gráfica que muestra los principales factores biológicos que impactan en la composición de la microbiota. En el eje de la y de la izquierda, el valor de R de ANOSIM, en el eje de la derecha el valor de pseudo-F de Permanova. El ambiente tiene un efecto mayor sobre la microbiota, seguido por el órgano y el estado de desarrollo. Modificado de Cornejo-Granados et al, 2018.

#### 1.1.4 Estructura del tracto digestivo en camarón

Los camarones tienen un tracto digestivo morfológicamente típico de los decápodos y se puede dividir en tres partes principales: el intestino anterior, intestino medio e intestino posterior. El intestino anterior comprende el esófago y el estómago cardiaco, es el sitio en donde comienza la digestión mecánica y extracelular. El intestino medio, el cual consiste en el estómago pilórico y el hepatopáncreas. Esta sección además se extiende como un túbulo delgado que inicia en la unión del estómago y el hepatopáncreas hasta el intestino posterior. Finalmente, el intestino posterior, el cual se prolonga hasta el ano. (Figura 5) (*Dall et al, 1990; McGaw & Curtis, 2013*).

El esófago (E) canaliza el alimento ingerido hacia el estómago cardiaco, encargado principalmente de la digestión mecánica y enzimática del alimento. El estómago cardiaco cuenta con un sistema de osículos calcificados que constituyen estructuras que permiten la digestión mecánica del alimento (L, M). Una vez llevada a cabo la digestión mecánica, el alimento pasa por un primer filtro localizado en la región ventral del estómago cardiaco (CF), para posteriormente ser transportado por los canales del filtro cardiopilórico (CP) a la cámara ventral del filtro pilórico (PF). Mientras que el alimento retenido en el estómago cardiaco, es posteriormente transferido al estómago pilórico, conformado por la cámara dorsal (DC), el filtro cardiopilórico (CP) y la cámara medial (MC), en esta última, el alimento es compactado. La fracción líquida obtenida pasa por un segundo proceso de filtrado (flechas) y los sólidos compactados son posteriormente transportados al intestino, en donde continúa su tránsito hasta el ano. Los filtros cardiopilórico y pilórico están conformados por numerosos canales que se encuentran cubiertos de estructuras tipo cerdas capaces de retener partículas mayores de ~ 1000 nm. Aquellas menores a este tamaño, pueden proceder hacia el atrio (A) y posteriormente al hepatopáncreas (T) (*Vogt, 2019; Pattarayingsakul et al, 2019*).

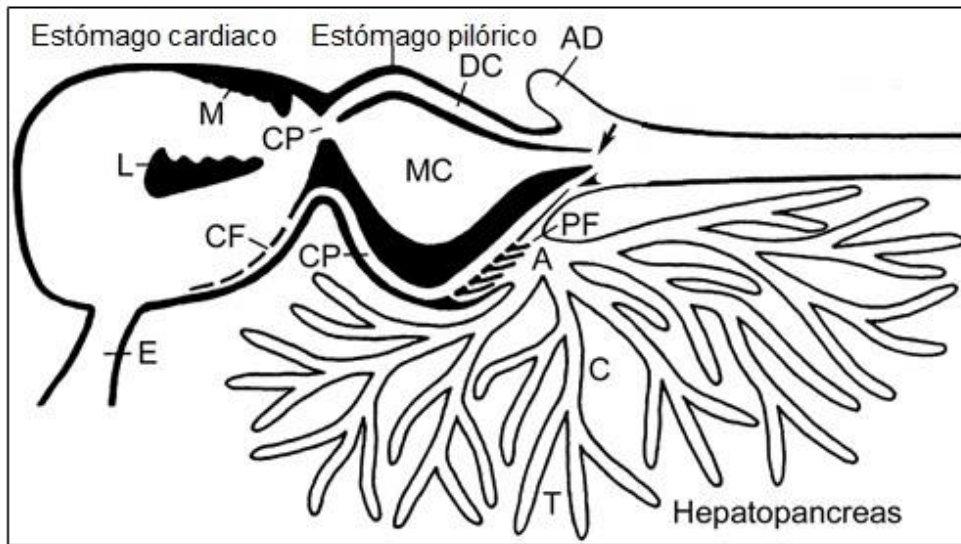
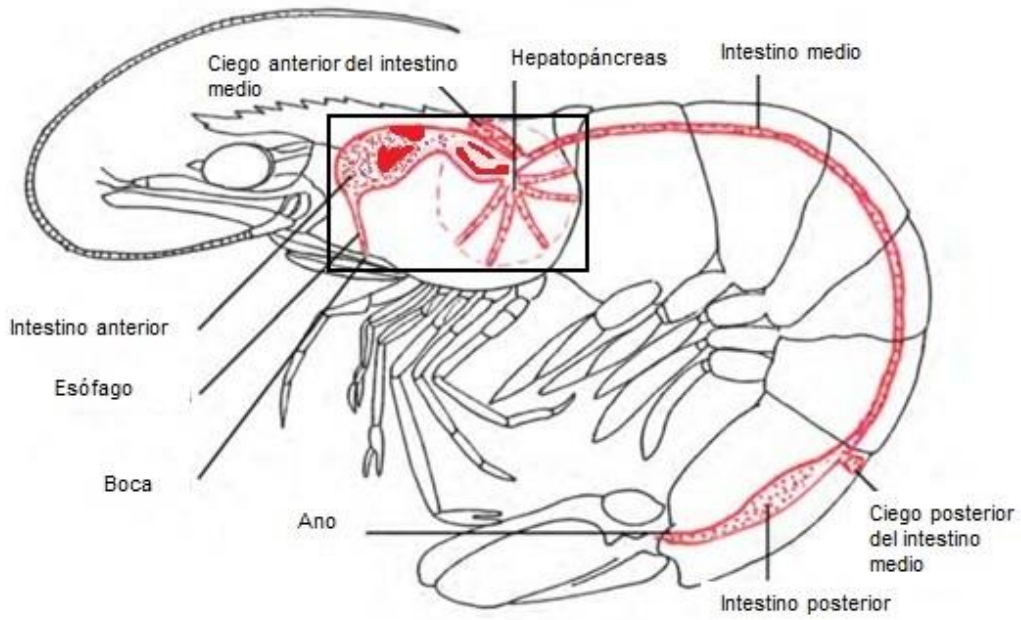


Figura 5. Estructura del tracto digestivo en camarón. Modificado de Vogt, 2002; Corteel, 2013.

### 1.1.4.1 Hepatopáncreas estructura y función en la digestión e inmunidad del camarón

En crustáceos decápodos, el hepatopáncreas, es la glándula principal involucrada en el proceso digestivo, teniendo un papel clave en la absorción y almacenamiento de nutrientes y energía, así como en procesos de excreción. Este órgano ocupa la mayoría de la cavidad cefalotorácica, ubicado posteriormente a la porción cardiaca del estómago. Cuenta con dos secciones separadas, llamadas lóbulos hepatopancreáticos izquierdo y derecho; sin embargo, ambos lóbulos no conectan entre ellos directamente, si no que se encuentran separados por una delgada lámina de tejido conectivo intersticial que forma un *septum* delgado y fibroso (Franceschini-Vicentini *et al*, 2009). Cada uno de los lóbulos hepatopancreáticos se conecta independientemente y en la región ventral al resto del tracto digestivo en la unión que hay entre el estómago y el intestino medio por un túbulo principal llamado “túbulo principal hepatopancreático” (Yellowlees D. 1998; Sousa & Petriella, 2000). En el sitio de unión, el recubrimiento epitelial del estómago termina de y comienza epitelio absorbente y secretorio pseudoestratificado del túbulo principal hepatopancreático. A medida que se extiende el túbulo principal hepatopancreático, este se ramifica extensamente en los múltiples túbulos hepatopancreáticos de extremo cerrado, o ciego, que conforman la unidad funcional y morfológica de cada uno de los lóbulos hepatopancreáticos (Figura 6).

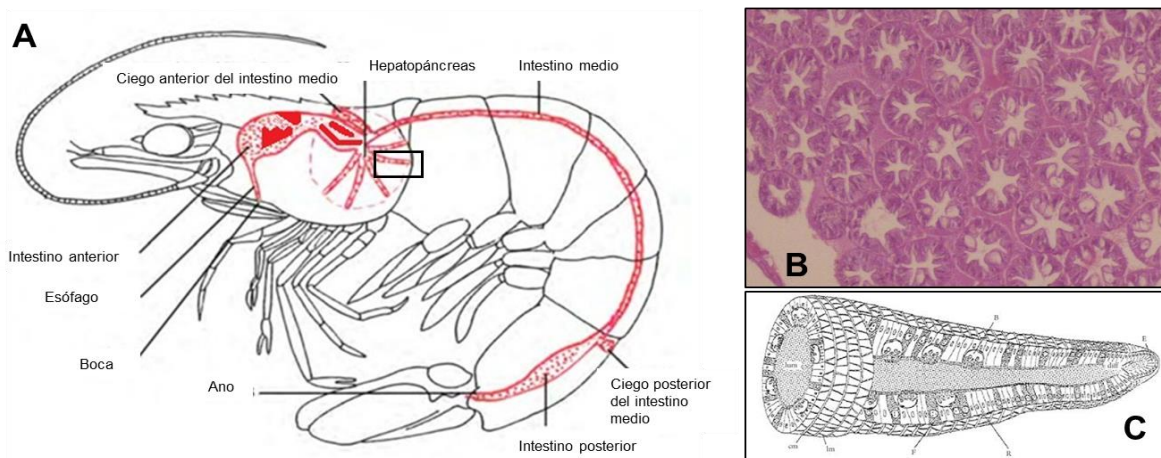


Figura 6. A) Esquema del tracto digestivo de *L. vannamei*. Modificado de Corteel, 2013. B) Corte transversal del hepatopáncreas que muestra cada uno de los túbulos que conforman el hepatopáncreas. Modificado de Kakoolaki *et al*, 2011. C) Estructura de un túbulo digestivo, unidad funcional del hepatopáncreas en un esquema de corte longitudinal. Modificado de Wetling, 2013



En el hepatopáncreas se sintetizan distintas hormonas y enzimas digestivas, como amilasa, maltasa, inulina, esterasa, proteasa, carboxipolipeptidasa, aminopolipeptidasa, dipeptidasa, celulasa, liquensa, quitinasa, alginasa, etc. (Van Weel, 1974; Yellowlees D. 1998; Sousa & Petriella, 2000). Aunado a esto, el hepatopáncreas tiene además un rol clave en la inmunidad del camarón. Las células epiteliales en el hepatopáncreas, son una fuente importante de moléculas involucradas en la inmunidad: varios tipos de lectinas, hemocianinas, ferritinas, proteínas con actividad antibacterial y antiviral, enzimas proteolíticas, inhibidores de serina proteasas bacterianas, moléculas de reconocimiento de superficie bacteriana, óxido nítrico, etc. (Figura 7). Algunos tipos celulares en el hepatopáncreas han mostrado incluso ser capaces de internalizar restos celulares de bacterias patógenas, para posteriormente liberar antígenos bacterianos. Por tanto, este órgano está íntimamente involucrado en el procesamiento de antígenos y eliminación de patógenos (Rószler, 2014).

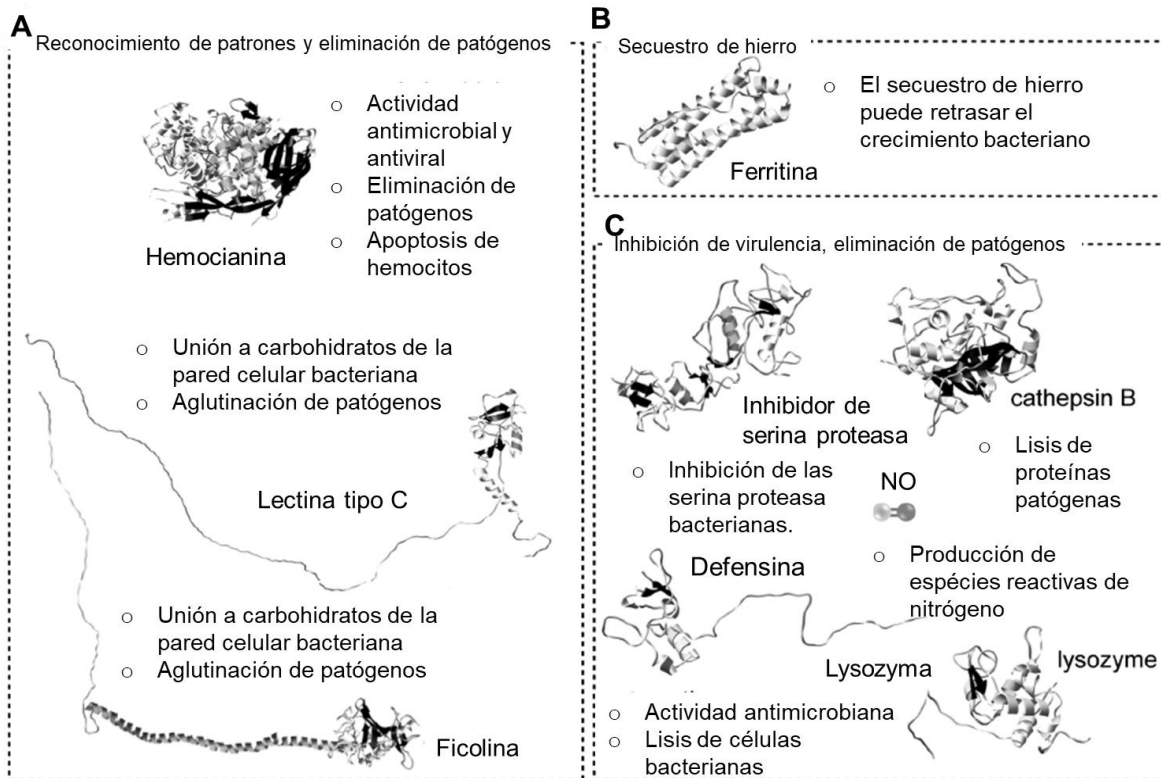


Figura 7. Moléculas del sistema inmune del hepatopáncreas en decápodos. A) Moléculas representativas en el reconocimiento y eliminación de patógenos. B) Secuestro de hierro. C) Inhibición de virulencia y eliminación de patógenos. Modificado de Rószler, 2014

### 1.1.4.2 Intestino: morfología y función

En los decápodos, el intestino consiste esencialmente en un tubo abierto continuo que se encuentra posterior a las estructuras que conforman la boca y se extiende hasta alcanzar la región posterior al ano (Vogt, 1996). El epitelio presenta una estructura estratificada, cuenta con un tipo celular dominante, de morfología cuboidal o cilíndrica que se ancla a la lámina basal y con un núcleo pequeño. En la zona apical, muestra microvellosidades bien desarrolladas y en la región citoplasmática se aprecian vacuolas que presentan actividad secretoria (Figura 8) (Sousa & Petriella, 2000). Las mucinas son el componente principal del mucus secretado por las células glandulares o calciformes y cuya función es contener contra las infecciones causadas por patógenos. En el intestino también proliferan y prosperan diversas comunidades microbianas cuya actividad funcional y estabilidad es igualmente importante para mantener la salud del camarón. (Derrien *et al*, 2010; Rungrassamee *et al*, 2014). Es un órgano que no solamente interviene en el proceso de absorción de nutrientes, sino que también tiene un papel importante en la protección del camarón (Gao *et al*, 2016; Rungrassamee *et al*, 2016).

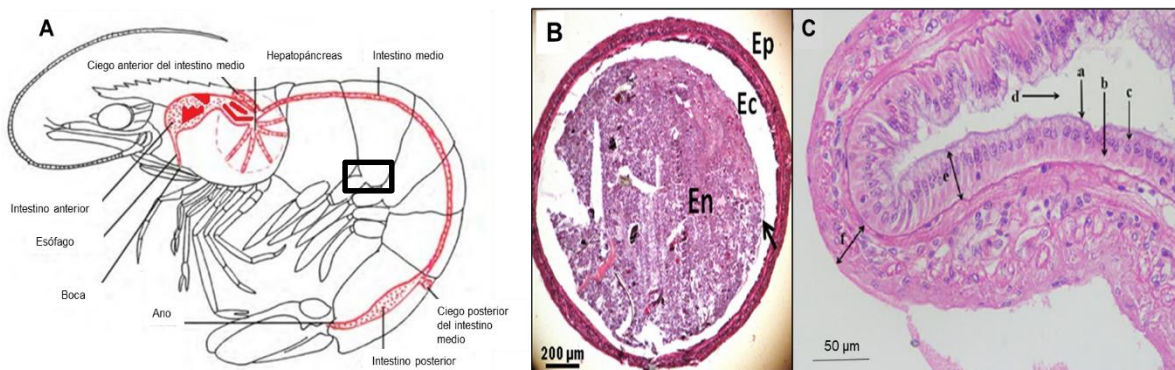


Figura 8. A) Esquema del tracto digestivo de *L. vannamei*. Modificado de Corteel, 2013. B) Microscopía del corte transversal del intestino de *L. vannamei*. EP) Epitelio, EC) Espacio ectoperitrófico, EN) Espacio endoperitrófico. Flecha) Membrana peritrófica. Modificado de Alexandre *et al*, 2014. C) Corte longitudinal del intestino de *L. vannamei*. a) Microvellosidades. b) Epitelio intestinal. c) Núcleo celular. d) Lumen intestinal. e) Altura del epitelio. f) Grosor de la pared intestinal. Modificado de Duan *et al*, 2019

La barrera intestinal representa una importante línea de defensa contra microorganismos potencialmente patógenos, por tanto, las condiciones ambientales capaces de ocasionar estrés y comprometer la integridad estructural ya sea de la mucosa intestinal, como del epitelio, y composición microbiana tienen un profundo impacto en la salud del camarón (Suo *et al*, 2017; Ogata *et al*, 2017).

### 1.1.4.3 La microbiota en el hepatopáncreas e intestino

El hepatopáncreas, tiene un papel fundamental en la digestión, por su rol clave en la absorción y almacenamiento de nutrientes y energía, así como en procesos de excreción, además de ser el órgano en el que se sintetizan distintas hormonas, enzimas digestivas y enzimas clave en la inmunidad del camarón (Van Weel, 1974; Yellowlees D. 1998; Sousa & Petriella, 2000). Estas moléculas tienen un papel importante en la respuesta del sistema inmune innato en el reconocimiento, unión y posterior eliminación de patógenos celulares y virus (Cao *et al*, 2014; Jiang *et al*, 2013). Cornejo-Granados *et al*, (2017) en un estudio que comprendió el análisis de siete regiones hipervariables (V2, V3, V4, V6, V7, V8, V9) del gen 16s del ARNr, encontraron que el hepatopáncreas es significativamente menos diverso y presenta una menor riqueza en comparación con el intestino, independientemente del entorno de crecimiento (*Wt* vs camarones de acuicultura). Las filas dominantes en el intestino son *Proteobacteria* y *Cyanobacteria*, a nivel de familia *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae*, mientras que los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, and *Paracoccus*. Con respecto al hepatopáncreas, *Proteobacteria* es la fila más abundante, a nivel de familia, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Moraxellaceae* y *Pseudomonadaceae* fueron las más abundante en los hepatopáncreas, el género, *Photobacterium*, *Acinetobacter* y *Vibrio* resultaron ser los géneros con mayor abundancia en los hepatopáncreas de los camarones *Wt*, mientras que en los cultivados: *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Escherichia*. Por su parte García-López *et al*, (2020) con el uso de una región hipervariable (V3 o V4), o un amplicón de dos regiones hipervariables contiguas (V3V4), encontraron que independientemente de la región utilizada, el intestino presenta una mayor riqueza, mientras que el hepatopáncreas una mayor diversidad (Figura 9). Con respecto a la taxonomía, se pudo observar que la fila *Proteobacteria* es la más abundante en el hepatopáncreas, mientras que los géneros más prevalentes en este órgano son *Methylobacterium*, un género no identificado de la familia *Methylobacteriaceae* y *Propionibacterium*. Tanto el filo *Proteobacteria* como algunos grupos taxonómicos pertenecientes al género *Methylobacterium*, son capaces de colonizar suelos, hábitats acuáticos y sedimentos (Dourado *et al*, 2015; Meena *et al*, 2015), y se han reportado como parte

de la microbiota del tracto digestivo de *L. vannamei* (Johnson *et al*, 2018; García-López *et al*, 2020), la prevalencia de estos grupos taxonómicos podría implicar una mayor presión selectiva del hepatopáncreas, con respecto al intestino, sobre la estructura de la microbiota, ya que en el hepatopáncreas se da la producción y secreción de moléculas antibacterianas como lectinas, hemocianinas y ferritinas, entre otras (Rószler, 2014). En el intestino, *Proteobacteria* y *Cyanobacteria* se reportaron como las fila más abundantes, mientras que a nivel de género, los más prevalentes, fueron un género no identificado del orden *Stramenopiles*, un género no identificado de la familia *Vibrionaceae*, *Vibrio* y *Propioniogenium*. Tanto las filas *Proteobacteria* como *Cyanobacteria* han sido reportadas como parte del bacterioplancton del intestino de camarón (Dourado *et al*, 2015; Meena *et al*, 2015; García-López *et al*, 2020), ambas filas consideradas prevalentes en ambientes de aguas costeras y salobres (Tai & Palenik, 2009; Chen *et al*, 2017; Zoqratt *et al*, 2018), dejando de manifiesto la importancia que tienen los diferentes factores ambientales en la microbiota del intestino de *L. vannamei*, ya que se ha reportado que este órgano presenta una mayor similitud en la microbiota con el ambiente en el que habita el camarón a comparación del hepatopáncreas. (Cornejo-Granados *et al*, 2017).

Éstos resultados son acordes a los presentados en otros estudios y que sugieren que la microbiota en el tracto digestivo de *L. vannamei*, es órgano-dependiente (Cornejo-Granados *et al*, 2017 & 2018, Cheung *et al*, 2015). Factores como la alimentación, contaminación, condiciones de hambruna, demandas fisiológicas causan alteraciones en la estructura morfológica e histológica, no solamente del tracto digestivo, también pueden llegar a causar una disrupción en las comunidades microbianas, y con esto, el potencial de propiciar la aparición de estados patológicos (Vogt, 1987).

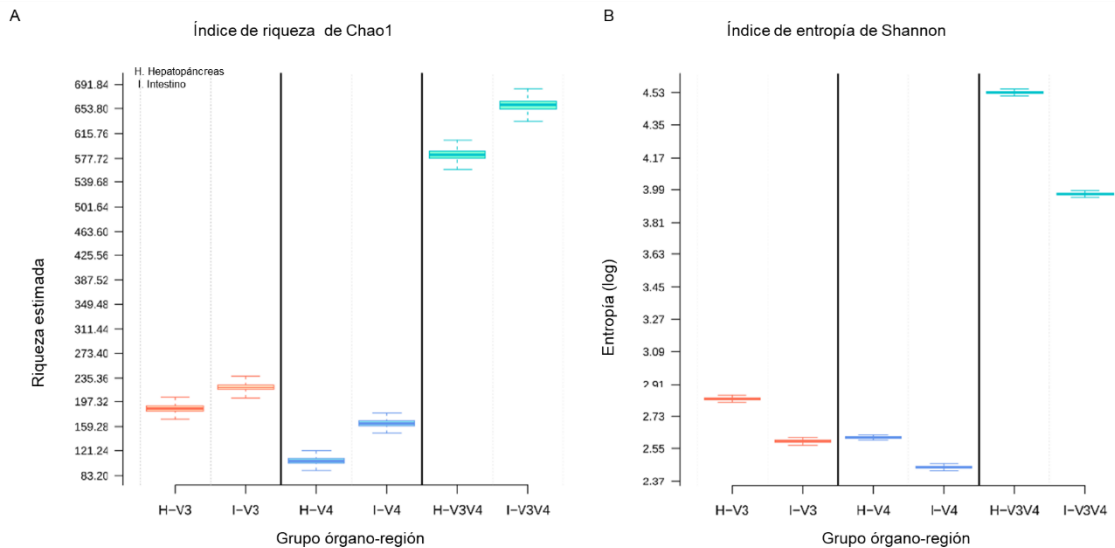


Figura 9. Independientemente de la región hipervariable, se observa la misma tendencia en los índices de la diversidad alfa: riqueza (A), y diversidad (B). Revelando un efecto órgano-dependiente en la composición de la microbiota. García-López *et al*, 2020.

### 1.1.5 Microbiota y estados patológicos en *L. vannamei*

Los crustáceos no poseen inmunoglobulinas o un mecanismo de defensa que confiera memoria inmunológica surgida después del primer encuentro con algún patógeno; sin embargo, su éxito evolutivo sugiere la existencia de un eficiente mecanismo de defensa. El sistema inmune no específico en invertebrados se compone de una amplia variedad de moléculas y células especializadas que circulan por el organismo. Las células involucradas en los mecanismos de defensa pueden generar respuestas inflamatorias, fagocíticas o citotóxicas. Esto, aunado a la gran variedad de moléculas antimicrobianas que generan, se traduce en una amplia gama de reacciones que los organismos invertebrados pueden emplear en respuesta a microorganismos o xenobióticos (Roch 1999; Martínez *et al*, 2007; Aguirre-Guzman *et al*, 2009).

Distintos estudios se han dado a la tarea de describir el impacto de distintos estados patológicos en la microbiota (Tabla 1). Yu *et al*, (2018) encontraron que las enfermedades: Necrosis Aguda Del Hepatopáncreas AHPND (Del inglés: *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*), Síndrome de Haces Blancas WFS (Del inglés: *White Feces Syndrome*), Síndrome de Muda en Mysis MMS (Del inglés: *Mysis Mold*

*Syndrome*), Síndrome de crecimiento lento SGS (Del inglés: *Slow Growth Syndrome*), encontrando que la abundancia relativa de *Gammaproteobacterias*, y potenciales patógenos oportunistas como *Alteromonadales* y *Aeromonadales* es mayor en camarones enfermos, mientras que hubo una disminución de *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. Además, encontraron que la diversidad de la microbiota en los intestinos de los camarones enfermos se vio disminuida de manera significativa en comparación con los camarones sanos. Por su parte, Cornejo-Granados *et al*, (2017) encontraron en intestinos de camarones enfermos (AHPND) un enriquecimiento de *Aeromonas taiwanensis*, además de *Microbispora rosea* y *Simiduia agarivorans*. Mientras que en hepatopáncreas de camarones enfermos encontraron un enriquecimiento de *Photobacterium angustum*. Interesantemente, reportaron que la diversidad y la riqueza en los intestinos de los camarones enfermos aumentó significativamente en comparación con los intestinos de los camarones sanos. Mientras que en los hepatopáncreas, la riqueza fue mayor, sin embargo, la diversidad se vio disminuida en comparación con los hepatopáncreas de los camarones saludables.

Tabla 1. Estudios que han evaluado el impacto sobre la microbiota de distintos estados patológicos.

Enfermedad	Órgano	Cambios en la microbiota	Estudio
<i>Síndrome de Haces Blancas WFS (Del inglés: White Feces Syndrome)</i>	Intestino	Sí	Xiong <i>et al</i> , 2017 & 2015
			Hou <i>et al</i> , 2018
			Yu <i>et al</i> , 2018
<i>Necrosis Aguda Del Hepatopáncreas AHPND (Del inglés: Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease)</i>	Hepatopáncreas, Intestino, estómago.	Sí	Dai <i>et al</i> , 2019
			Cornejo-Granados <i>et al</i> , 2017
			Chen <i>et al</i> , 2017

<i>Síndrome de las manchas blancas WSSV (Del inglés: White Spot Syndrome Virus)</i>	Intestino	Sí	Yu <i>et al</i> , 2018 Wang <i>et al</i> , 2019
<i>Mionecrosis Infecciosa Viral IMNV (Del inglés: Infectious myonecrosis virus)</i>	Intestino	No	Forte <i>et al</i> , 2019
<i>Síndrome de crecimiento lento SGS (Del inglés: Slow Growth Syndrome)</i>	Hepatopáncreas, intestino	Sí	Shi <i>et al</i> , 2017 Xiong <i>et al</i> , 2017b
<i>Síndrome de Muda en Mysis MMS (Del inglés: Mysis Mold Síndrome)</i>	Todo el camarón, intestino	Sí	Yu <i>et al</i> , 2018 Zheng <i>et al</i> , 2017
<i>Camarón de algodón CSD (Del inglés: Cotton Shrimp-like Disease)</i>	Intestino	Sí	Zhou <i>et al</i> , 2019

Los distintos estados de enfermedad restan importancia a los factores determinísticos que le dan forma a la microbiota en animales saludables (Yu *et al*, 2018); por ejemplo, la respuesta inflamatoria puede alterar el balance de una microbiota saludable, con lo cual se ve minimizada la pérdida de resistencia a la colonización del hospedero, y con esto conferir una ventaja competitiva a potenciales patógenos sobre los microorganismos comensales (Kamada *et al*, 2013). El grado de disbiosis de la microbiota está íntimamente relacionado con la severidad o el riesgo de la aparición de enfermedad en el hospedero. Entender la manera en la que una comunidad microbiana compleja se establece e interactúa con el sistema inmune, la dinámica de esta comunidad en función de condiciones

ambientales, alimentarias, estrés, o condiciones de salud, es fundamental y es un campo abierto de investigación que se encuentra retomando importancia en los crustáceos.

## **1.2 Moduladores de la microbiota en *L. vannamei***

Distintas aproximaciones se han desarrollado para modular la microbiota de las distintas especies de camarón cultivable que permitan mejorar su salud, disminuir la propensión a ser colonizados por patógenos y aumentar la productividad durante su cultivo. Una de las aproximaciones que se han implementado para disminuir la incidencia de enfermedades es mediante la administración de dietas suplementadas con bacterias reportadas como probióticas, como lo son los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*,. Este tipo de bacterias pueden ejercer su actividad probiótica en el tracto digestivo de *L. vannamei* al inhibir la proliferación de patógenos, estimular la respuesta inmune, promover el crecimiento del camarón, la supervivencia o adquisición de nutrientes (Hao *et al*, 2014; Javadi & Khatibi, 2017; Tepasamorndech *et al*, 2019; Wang *et al*, 2019b). Otra de las aproximaciones que se han evaluado, consiste en la modulación de la microbiota mediante la administración de dietas suplementadas con prebióticos, principalmente polisacáridos como inulina, amilosa o fructooligosacáridos, los cuales son capaces de promover el crecimiento, supervivencia e impactar de manera positiva en el rendimiento inmunológico de *L. vannamei*, así como reducir la abundancia relativa de potenciales patógenos como los géneros *Formosa* y *Pseudoalteromonas*, o las especies *Vibrio tubiashii* y *V. parahaemolyticus* (Luna-González *et al*, 2012; Bolívar-Ramírez *et al*, 2013; Hu *et al*, 2018; Duan *et al*, 2019).

Una amplia variedad de inmunoestimulantes ha sido utilizados para mejorar la producción de organismos acuáticos cultivados, entre estos: anti-lipopolisacáridos, ácidos grasos de cadena corta, polisacáridos, etc. (Duan *et al*, 2017; Supungul *et al*, 2017; da Silva *et al*, 2016; Wu *et al*, 2007; Siwicki *et al*, 1994; Chen & Ainswort, 1992).



### 1.3 Ácidos grasos de cadena corta y su efecto *L. vannamei* y en su microbiota

La microbiota intestinal produce ácidos grasos de cadena corta mediante los procesos de fermentación de la fibra resistente a la digestión, lo que provee al hospedero con nutrientes para la regeneración, reparación y proliferación celular en el epitelio intestinal; además, han mostrado tener un efecto positivo en la actividad enzimática digestiva. Aunado a lo anterior, los ácidos grasos de cadena corta, también tienen el potencial de inhibir la proliferación de bacterias patógenas (Becattini *et al*, 2016; Iwanek *et al*, 2016; Koh *et al*, 2016).

da Silva *et al*, (2016) encontraron que dietas suplementadas con butirato o propionato, tienen un efecto positivo sobre el crecimiento de *L. vannamei*, también promovió una mayor retención de nitrógeno, lo que indica una mejora en la digestibilidad de las proteínas, de igual manera, reportaron un efecto positivo de la respuesta inmune, reflejado por una mayor aglutinación de suero en los camarones alimentados con las dietas suplementadas., aunado a esto, reportaron que la administración de dietas suplementadas con butirato disminuye la abundancia de *Vibrio* en intestinos de *L. vannamei* (da Silva *et al*, 2016).

La administración de dietas suplementadas con polihidroxibutirato (PHB), ha mostrado tener un efecto positivo en la digestibilidad de lípidos y polisacáridos en *L. vannamei*, reflejado en un aumento de la actividad enzimática de proteasas, tripsina, quimotripsina y amilasa en el intestino de *L. vannamei*, aunado a un incremento significativo en la longitud y grosor de las microvellosidades en este órgano (da Silva *et al*, 2016). Duan *et al*, (2017) encontraron que la suplementación con PHB incrementa la expresión de genes *TOR*, *4E-BP*, *eIF4E1 $\alpha$* , y *eIF4E2*, de la vía mTOR. La suplementación en la dieta con 1% de PHB incrementa tanto la diversidad como riqueza en el intestino de *L. vannamei*. A nivel de fila, *Proteobacteria* se encontró significativamente enriquecida en los intestinos de los camarones alimentados con la dieta suplementada con PHB al 1%, A nivel de clase, *Gammaproteobacteria* y *Bacilli*. Mientras a nivel de género, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Paenibacillus* y *Bdellovibrio* se encontraron enriquecidos en los intestinos de los camarones alimentados con la dieta suplementada.

#### 1.4 Los polisacáridos modulan la microbiota del tracto digestivo de *L. vannamei*

El uso de prebióticos es una de las aproximaciones que se han adoptado para modular la microbiota de las especies que se obtienen de la acuicultura, principalmente los polisacáridos (carragenanos, laminaranos,  $\beta$ -glucanos, quitosan, quitina, fucoidanos, oligosacáridos, etc.), capaces de regular el crecimiento, e impactar de manera positiva en la estimulación inmunológica de especies acuáticas (Figura 10) (Meshram *et al*, 2015; Sivagnanavelmurugan *et al*, 2014; Deng *et al*, 2015; Murthy *et al*, 2009; Rodríguez *et al*, 2007; Kumar *et al*, 2006; Chang *et al*, 2000).

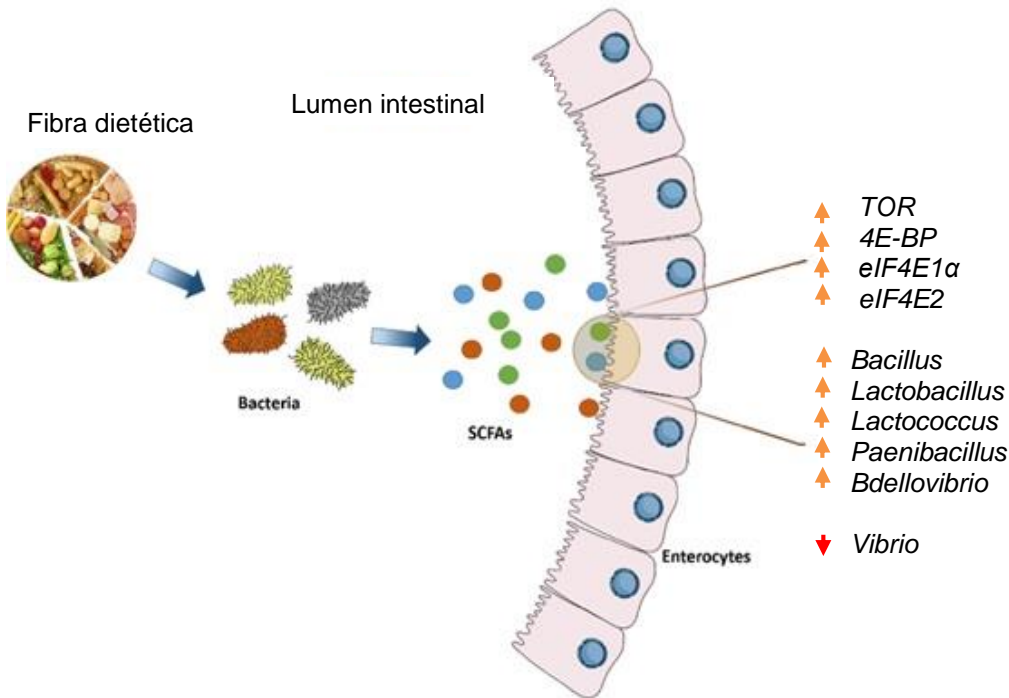


Figura 10. Los ácidos grasos de cadena corta en el intestino promueven el enriquecimiento de géneros probióticos y la expresión de genes que promueven la integridad estructural en el intestino. Así mismo reducen la abundancia de potenciales bacterias patógenas. Modificado de Rahim *et al*, 2019.

Zhai *et al*, (2019) reportó que el uso de dietas suplementadas con polisacáridos extraídos de *Astragalus membranaceus*, y administradas a *L. vannamei*, tuvo un efecto protector en contra de la infección causada por *V. parahaemolyticus*, reflejado en una disminución de la mortalidad acumulada, en

comparación con el grupo de camarones a los cuales no se les suministró el prebiótico. Duan *et al*, (2019) encontraron que la suplementación dietética con almidón resistente a la digestión tuvo un efecto positivo en *L. vannamei*, mejorando la morfología de las células epiteliales, grosor del epitelio y de la lámina basal (Figura 11); así como una mayor actividad de enzimas digestivas, como amilasas, lipasas, tripsinas y pepsinas. La actividad de las enzimas fenol oxidasa, y óxido nítrico sintasa de igual manera se vieron incrementadas en los camarones alimentados con una dieta suplementada con amilasa, así como el contenido de óxido nítrico y la capacidad antioxidante total.

Los cambios en la microbiota intestinal ocasionados por la administración de amilosa resistente a la digestión también incrementaron la abundancia, a nivel de filo de *Proteobacterias*, *Verrucomicrobia* y *Acidobacteria*, mientras provocó una reducción de *Bacteroidetes* y *Tenericutes*. A nivel de clase, la abundancia de *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, y *Verrucomicrobiae* se vio incrementada, en los grupos alimentados con una dieta suplementada con amilosa, mientras que disminuyó la frecuencia relativa de *Flavobacteriia* con respecto al grupo alimentado con la dieta control. A nivel de género, la abundancia de bacterias potencialmente benéficas se vio aumentada en los grupos alimentados con amilosa, entre ellas, *Lutimonas*, *Ruegeria*, *Shimia*, *Mesoflavibacter* y *Mameliella*, mientras que la abundancia de géneros potencialmente patógenos, como *Formosa* y *Pseudoalteromonas* se vieron disminuidos. La adición de almidón con alta concentración de amilosa, asimismo propició el incremento de ácidos grasos de cadena corta, como ácido propiónico, ácido butírico, ácido acético y ácido valérico en los camarones alimentados con amilosa resistente a la digestión con respecto a los camarones del grupo control.

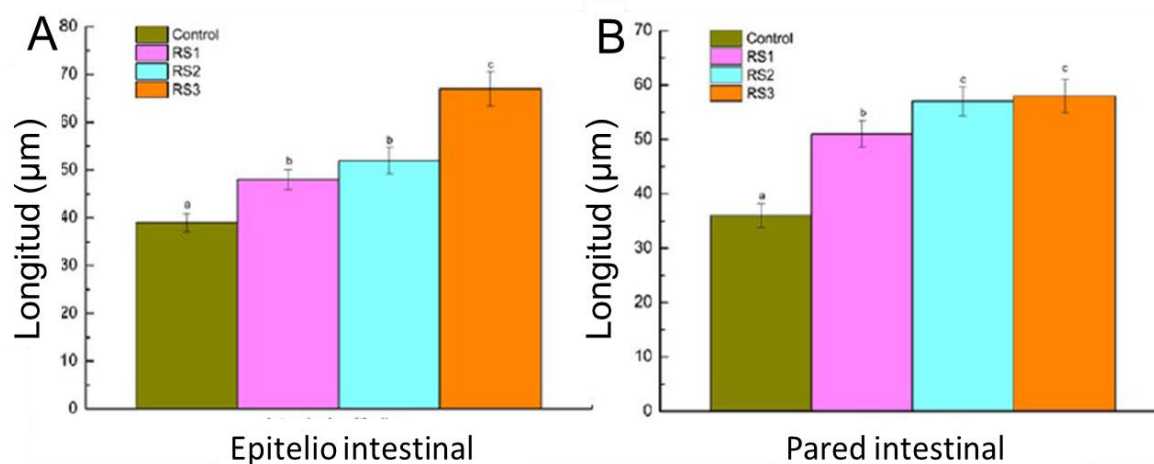


Figura 11. Comparación del tejido intestinal de *L. vannamei* después de ser alimentado por 56 días con una dieta suplementada con almidón resistente a la digestión a diferentes concentraciones: Control, 0%; RS1, 10 g/kg; RS2, 30 g/kg; RS3 50 g/kg. Tanto la longitud del epitelio intestinal (A) como la pared intestinal (B) se ven aumentados por la suplementación con prebiótico. Modificado de Duan et al, 2019

### 1.5 Fructooligosacáridos e Inulina: impacto en la microbiota del tracto digestivo de *L. vannamei*

La inulina, o fructanos tipo inulina, representan el principal polisacárido utilizado como prebiótico, encontrado principalmente en especies vegetales como carbohidrato de almacenamiento energético (Niness, 1999; Roberfroid, 2005). Químicamente, la inulina y los fructanos tipo inulina están conformados por estructuras lineales polidispersas de carbohidratos unidos casi exclusivamente mediante enlaces fructosil-fructosa  $\beta$  (2-1), en ocasiones pudiendo estar presente una  $\alpha$ -D-glucosa, debido a la conformación  $\beta$  en el carbono anomérico de las fructosas que la conforman (Figura 12). La inulina es resistente a ser hidrolizada por las enzimas digestivas, pero es susceptible a ser fermentada en el tracto digestivo (Roberfroid, 2005).

El uso de inulina, como prebiótico utilizado en la suplementación de alimentos para *L. vannamei*, ha mostrado incrementar la actividad del sistema fenol oxidasa, lo que implicaría un potencial uso como promotor de la protección contra WSSV o algunas bacterias patógenas del género *Vibrio* (Luna-González et al, 2012; Bolívar-Ramírez et al, 2013).

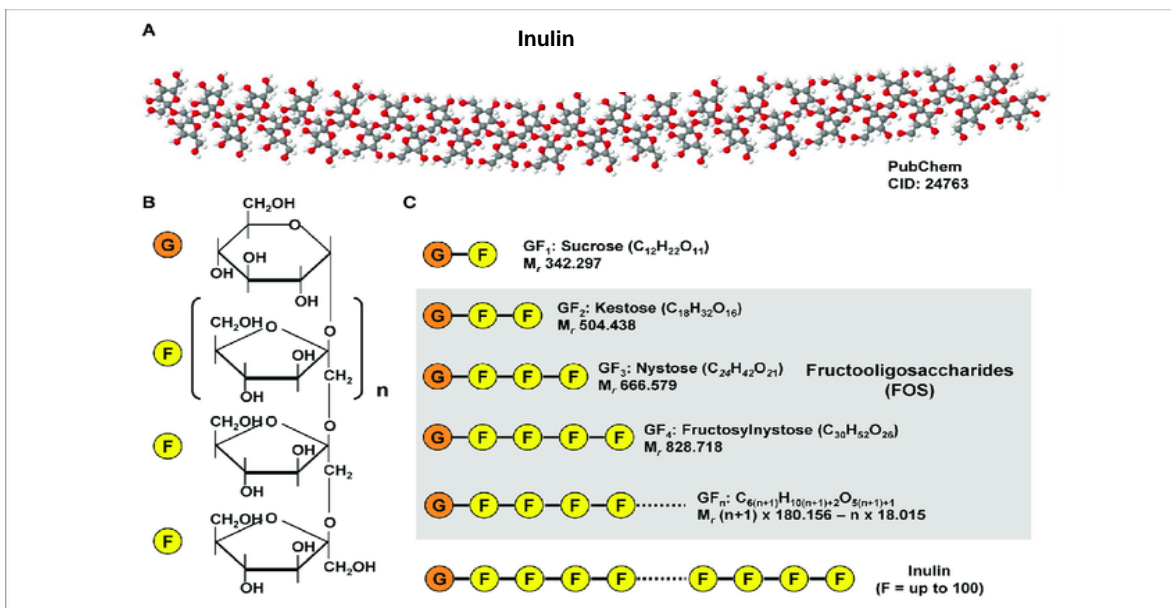


Figura 12. Estructura química de la inulina y fructooligosacáridos. A) Las inulinas son resistentes a la digestión, está conformada por fructosas en una organización de cadenas lineales en  $\beta$ -2,1 con ramificaciones en  $\beta$ -2,6. B) Los fructooligosacáridos contienen un número variable de unidades  $\beta$ -D-fructofuranosil con una unidad glucosilada. C) Los fructooligosacáridos representativos son cetosa, nystosa, fructosilnystosa, difiriendo en el número de residuos de fructosa. Modificado de, Lambertz et al, 2017

El uso de fructooligosacáridos ha demostrado tener un efecto positivo en el aprovechamiento de nutrientes, como promotor del crecimiento y de la resistencia de distintas especies animales, al modificar la microbiota gastrointestinal (Li *et al*, 2007, Zhou *et al*, 2007). Hu *et al*, (2018) evaluaron una dieta suplementada con fructooligosacáridos (FOS) en *L. vannamei* encontrando un mejor rendimiento en el crecimiento y ganancia de peso en los grupos suplementados con FOS posiblemente por un aumento en la actividad de las enzimas digestivas. Aunado a lo anterior, es notable que la abundancia relativa de las especies reportadas como patógenos, *V. tubiashii* y *V. parahaemolyticus*, disminuyó en los grupos tratados con FOS. Zhou *et al*, (2007) encontraron una tendencia favorable en el crecimiento de *L. vannamei*, al ser alimentado con una dieta suplementada con FOS (Profeed®). El conteo total de hemocitos, el estallido respiratorio, también se vieron aumentados en los grupos alimentados con la dieta suplementada con FOS con respecto al grupo control. Li *et al* (2007), al evaluar una dieta suplementada con FOS, encontraron un aumento en el conteo total de hemocitos, y en el estallido respiratorio. La adición del prebiótico mostró incrementar la abundancia de los géneros *Alkalibacillus* y *Micrococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus faecalis* en el

intestino de *L. vannamei*, los cuales comprenden bacterias gram-positivas, aerobias y halófilas (Jeon *et al*, 2005; Joshi *et al*, 2008). *Aquabacterium* y *Rosebacter* son otros de los géneros cuya abundancia se vio aumentada en camarones alimentados con una dieta suplementada con FOS, siendo el primero de bacterias microaerófilas, capaces de utilizar nitritos y oxígeno como aceptor de electrones; el segundo genero comprendido por bacterias fotosintéticas encontradas en ambientes marinos (Wagner-Döbler & Biebl, 2006). Estos cambios en la microbiota del intestino de *L. vannamei*, pueden implicar un efecto benéfico en su salud al incrementar la respuesta inmune no específica y al incrementar la concentración de ácidos grasos de cadena corta, como se ha reportado en otros estudios (Li *et al*, 2007; Bailey *et al*, 1991).

### 1.5 Agavina: prebiótico capaz de modular la microbiota.

La agavina, o fructanos de agave, son mezclas complejas de fructanos presentes en las especies de agave, como *Agave tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. fourcroydes*. A diferencia de la inulina, que presenta solo enlaces  $\beta$  (2-1) (Figura 13), la agavina está compuesta de mezclas complejas con enlaces  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6), con una molécula de glucosa en la parte externa o en la parte media llamados graminanos o fructanos de tipo neoserie respectivamente (López *et al*, 2003; Mancilla-Margalli & López, 2006).

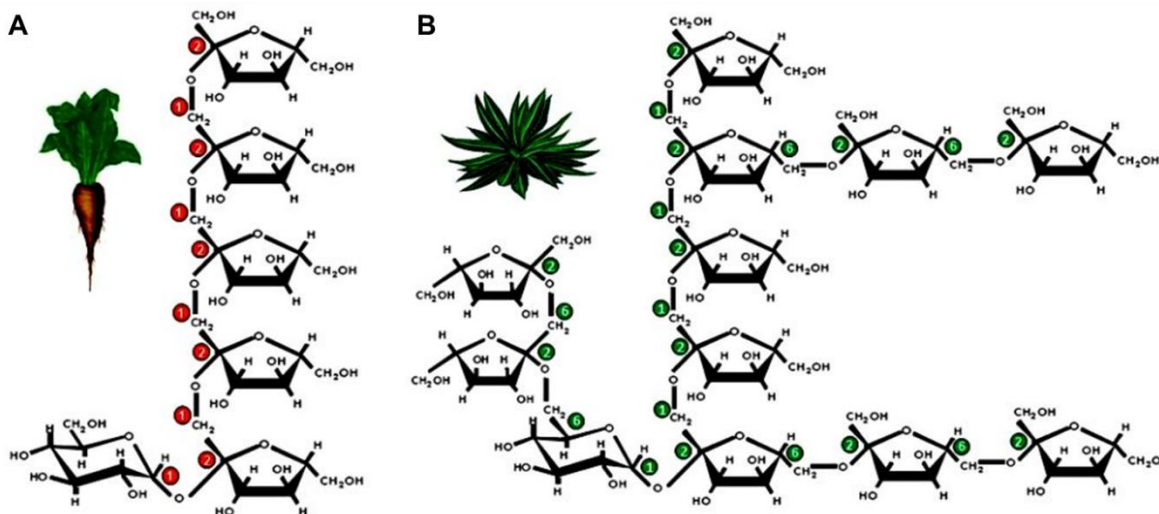


Figura 13. Representación esquemática de las principales diferencias estructurales entre la inulina (A) y la agavina (B)

Las agavinas funcionan como fibra dietética resistente a la digestión, utilizadas como prebióticos, teniendo el potencial para promover el crecimiento de bacterias probióticas, así como la producción de ácidos grasos de cadena corta, que pueden servir como indicadores de una microbiota intestinal sana. Santiago-García & López (2014) encontraron que la ingesta energética fue menor en ratones alimentados con una dieta suplementada con agavina de *A. potatorum* y *A. angustifolia*, con respecto a un grupo control, atribuido a una mayor concentración de glucagón-1 en la región proximal y media del colon, aumentando incluso el doble en la región media del colon en los ratones alimentados con agavina de *A. angustifolia*. La concentración de gherelina en la vena porta, por su parte, fue inferior en los ratones alimentados con las dietas suplementadas con prebióticos con respecto a los ratones del grupo control. El análisis del peso del cecum fue significativamente mayor en los ratones alimentados con la dieta suplementada con el prebiótico, además de una considerable reducción del pH, atribuido a la concentración de ácidos grasos de cadena corta (propiónico y butírico), la cual se vio promovida por la adición de agavina a la dieta. Huazano-García *et al*, (2017) evaluaron el impacto de dietas suplementadas con agavina u oligofruktosa, sobre la microbiota de ratones alimentados previamente con una dieta alta en grasa. Los ratones alimentados con la dieta suplementada con los probióticos mostraron una reducción de peso más acelerada, con respecto a los ratones alimentados con una dieta sin prebiótico. El análisis de la región hipervariable V4 del gen 16s rRNA, mostró que la dieta suplementada con agavina promueve la abundancia de los géneros *Citrobacter* y *Klebsiella*, mientras que causó una disminución de los géneros *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Prevotella* y *Coprococcus*. La dieta suplementada con oligofruktosa causó un incremento de los géneros *Prevotella*, *Faecalibacterium* y *Allobaculum*, mientras que causó una disminución de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Odoribacter*, *Adlercreutzia*, *Desulfovibrio* y *Ruminococcus*.

Algunos estudios se han dado a la tarea de evaluar el efecto de fructanos de agave (agavina) como promotores del crecimiento, resistencia a patógenos o impacto en el sistema inmune de *L. vannamei* (Tabla 2), Estos efectos se han

reportado como un aumento en el conteo total de hemocitos en hemolinfa o en una menor mortalidad al ser retados con patógenos como WSSV (Partida-Arangure *et al*, 2013). Aunque cabe señalar que dichos trabajos no analizaron el efecto de la agavina en la microbiota.

Tabla 2. Estudios que han evaluado el efecto de alimentos suplementados con agave.

Especie	Órgano	Efecto	Referencia
A. <i>tequilana</i>	Hemolinfa	Menor carga viral de WSSV.	Luna-González
		Incremento en la supervivencia contra WSSV.	<i>et al</i> , 2012
		Incremento significativo de la actividad fenol oxidasa.	Partida-Arangure <i>et al</i> , 2013
		Incremento en el conteo total de hemocitos.	Gutiérrez-Dagnino <i>et al</i> , 2015
A. <i>lechuguilla</i>	Hemolinfa, hepatopáncreas	Promotor del crecimiento.	Peña-Rodríguez
		Aumento de la altura del epitelio y el área de los túbulos del hepatopáncreas.	<i>et al</i> , 2015

A pesar de que existen en la literatura diferentes trabajos que evalúan distintas fibras resistentes a la digestión en el rendimiento del cultivo de varias especies de camarón, en comparación a los trabajos en otras especies, son pocos los que evalúan el impacto sobre la microbiota (Andrino *et al*, 2015; Li *et al*, 2018; Li *et al*, 2018b). Por tanto, es necesario indagar más en el efecto que tienen las distintas fibras en función de su estructura, tipos de enlace, grado de polimerización, etc. sobre la composición de la microbiota en *L. vannamei*.

En este trabajo se evaluó el impacto que tienen dietas suplementadas con distintas concentraciones de agavina, en la microbiota de los principales órganos del tracto digestivo de *L. vannamei*, y el efecto en su crecimiento en condiciones reales de cultivo.



## **2 Hipótesis**

El alimento suplementado con agavina tiene un efecto favorable la eficiencia alimenticia del cultivo de *L. vannamei* a través de cambios en la microbiota del intestino y el hepatopáncreas, además de promover el enriquecimiento de microorganismos con potencial probiótico en comparación con alimento sin fibra.

## **3 Objetivos**

### **3.1 General**

Evaluar el impacto de una dieta suplementada con 2 y 10% de agavina en el rendimiento y la composición de la microbiota del hepatopáncreas e intestino de *L. vannamei* en un bioensayo bajo condiciones reales de cultivo.

### **3.2 Específicos**

- Determinar el efecto de las diferentes dietas, en el crecimiento y sobrevivencia de *L. vannamei*.
- Evaluar el impacto en la microbiota del hepatopáncreas e intestino de *L. vannamei*, en función de las diferentes dietas.
- Valorar el potencial de la agavina para enriquecer bacterias probióticas en el intestino y hepatopáncreas de *L. vanamei*.

## 4. Procedimiento

### 4.1 Bioensayo

El bioensayo se realizó en el municipio de Ahome, Sinaloa, en la granja acuícola “Camarones el Renacimiento S.P.R. de R.I.”. Consistió de tres grupos experimentales, con 20 camarones para cada grupo, y cada grupo experimental realizado por triplicado (Figura 14).

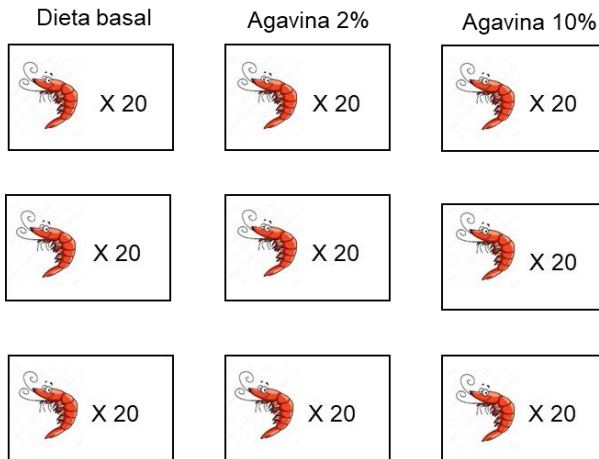


Figura 14. Esquema que muestra el diseño experimental del bioensayo

Los camarones de cada grupo se mantuvieron en jaulas de 1 m<sup>2</sup> en la base y con 1.5 m de alto para un total de 9 jaulas (Figura 15).

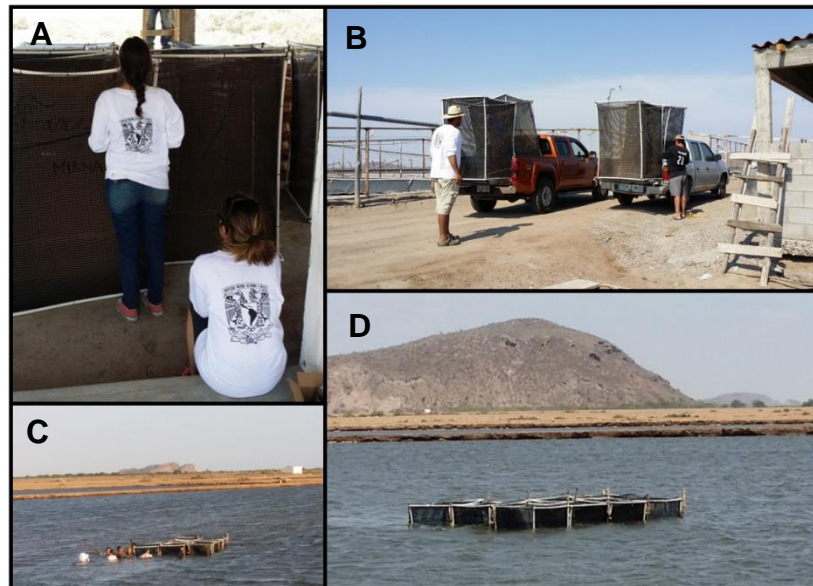


Figura 15. Figura que muestra (A) la preparación de las jaulas para el bioensayo. (B) Estructura final de las jaulas y su transporte. (C y D) Instalación, en el estanque R4, de la granja acuícola “Camarones el Renacimiento S.P.R. de R.I.”

La alimentación se realizó 2 veces al día: a las 7 HRS y 17 HRS; de acuerdo a la siguiente fórmula:

Alimento requerido (kg) = (biomasa inicial [Kg]) (3%) / 100,  
obteniendo como biomasa 109.7 g y tomando un 3% del valor obtenido como alimento en base a la biomasa, la cantidad de alimento inicial que se aplicó fue de 3 gramos por ración durante 4 días a todos los tratamientos, el alimento se pesó con una balanza analítica obteniendo la porción exacta, posterior a los cuatro días mencionados, el alimento se suministró *ad libitum*. Se depositó el alimento en charolas de metal con malla nylon de 1000  $\mu\text{m}$  con una charola para cada jaula. De igual manera se realizaron mediciones de los parámetros físico-químicos del agua durante la mañana, a las 5 HRS. y durante la tarde, a las 18 HRS. Los cuales consistieron en: pH, temperatura, salinidad, y oxígeno disuelto. El bioensayo tuvo una duración de 28 días.

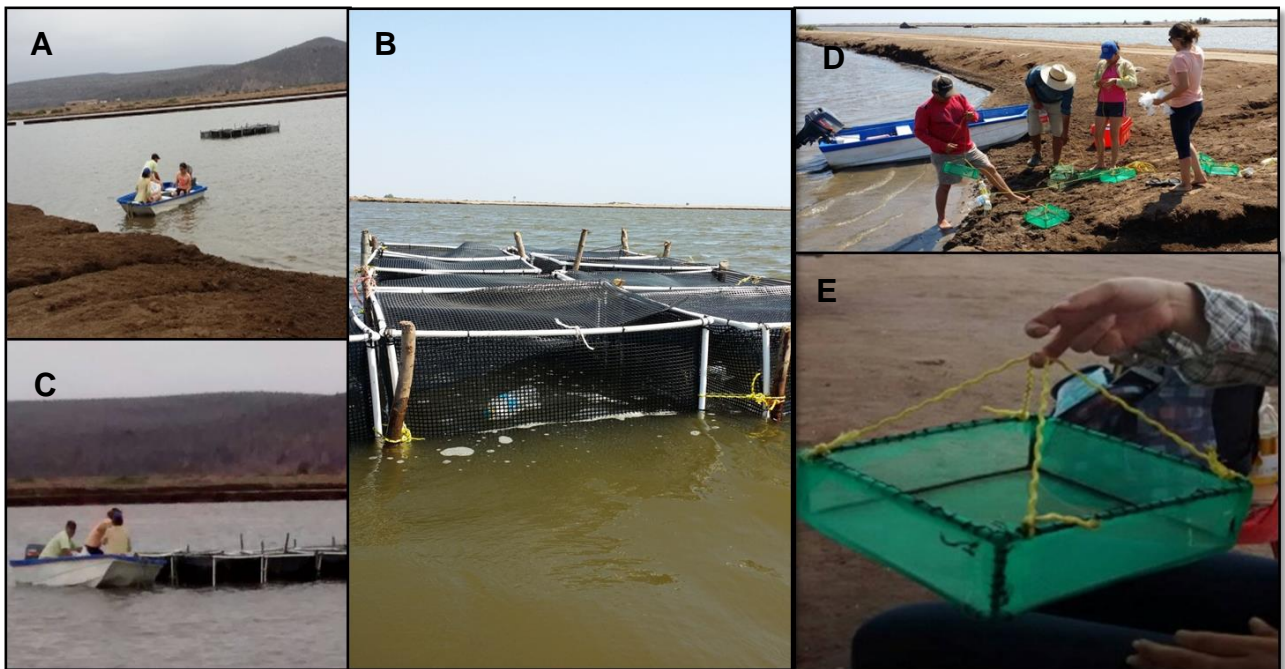


Figura 16. Figura que muestra (A, B y C) la instalación y ubicación final de las jaulas para el bioensayo en el estanque R4, de la granja acuícola "Camarones el Renacimiento S.P.R. de R.I" (D y E) Estructura de las charolas con las que se alimentó a los camarones durante el bioensayo.

#### 4.2 Formulación de las dietas experimentales y bioensayo.

A cada grupo se le administró formulaciones similares de alimento basado en harina de soya, harina de ave, harina de pescado, gluten de trigo, aceite de

pescado, gelatina, benzoato de sodio y BHT (Tabla 3), cuya variación fue la adición de agavina a diferentes concentraciones como fibra dietética, teniendo un contenido energético de 1750 KJ/g reemplazando la cantidad correspondiente de almidón.

Tabla 3. Ingredientes (g 100 g<sup>-1</sup> de alimento) y composición proximal de las dietas experimentales. Dieta basal (DB), Agavina 2% (A 2) y Agavina 10 % (A 10)

Ingredientes	Dieta basal	Agavina 2%	Agavina 10%
Harina de soya	12	12	12
Harina de ave	15	15.2	15.4
Harina de pescado	14.4	13.9	12.8
Gluten de trigo	10	10	10
Aceite de pescado	1.9	2	2
Almidón	37.2	35.2	27.1
Aceite de soya	2.2	2.2	2.4
Gelatina	6	6.2	7
ROVIMIX	1	1	1
STAY-C	0.07	0.07	0.07
Agavina	0	2	10
Benzoato de sodio	0.25	0.25	0.25
BHT	0.01	0.01	0.01
Celulosa	0	0	0
<b>Composición proximal</b>			
Humedad	0	0	0
Proteína	36.79	36.746	36.792
Lípidos	8.2	8.2	8.2
Ceniza	5.4245	5.37026	5.14902

A partir de los pesos obtenidos al final del ensayo se determinó:

Peso inicial (PI);

Peso final (PF);

Alimento total ingerido (ATI);

Peso ganado (PG),

$$PG = PF - PI;$$

Porcentaje de peso ganado (PPG) (Barraza-López, 2015),  $PPG = 100 * (PG) / PI$ ;

Factor de conversión alimenticia (FCA) (Martínez-Córdova *et al.*, 2011),

$$FCA = ATI / PF;$$

Tasa de eficiencia proteica (TEP) (Kaushik *et al.*, 2004),

$$TEP = PG / \text{Proteína total ingerida (g)};$$

Tasa específica de crecimiento (TEC) (González-Félix *et al.*, 2018),

$$TEC = 100 * ((\ln Pf - \ln Pi) / \sum \text{días});$$

Coefficiente térmico de crecimiento (CTC) (Zhou *et al.*, 2017),

$$CTC = 100 * ((Pf^{1/3} - Pi^{1/3} / \sum \text{días} * T (^{\circ}C))$$

### **4.3 Toma de muestras**

Se dispusieron de tubos *Eppendorf* de 1.5 ml estériles y sellados en la tapa con papel *Parafilm* conteniendo 1 ml de *RNAlater*. Primeramente, se recolectaron los camarones de cada una de las jaulas. Usando guantes estériles de nitrilo, se lavó la superficie del camarón con una solución de cloro al 10 %, posteriormente se enjuagó la superficie con agua destilada, enseguida se sacrificó a cada uno de los camarones removiendo la cabeza y extrayendo el hepatopáncreas y el intestino con ayuda de un bisturí estéril. El hepatopáncreas y el intestino de cada camarón fueron almacenados por separado en los tubos *Eppendorf*, asegurando que quedara totalmente cubierto por el *RNAlater*; posteriormente se almacenaron a 4 °C por 24 horas y luego se almacenaron a - 80 °C

### **4.4 Extracción, amplificación y secuenciación del DNA**

La extracción de DNA de cada una de las muestras se llevó a cabo con el kit *ZR Soil MicroTube DNA Miniprep*. La cuantificación de DNA se llevó a cabo mediante *Qubit*. Posteriormente se amplificaron, mediante PCR, las regiones

hipervariables V3-V4 del gen 16s de la extracción de cada muestra de acuerdo al protocolo de *Illumina MiSeq 16s*, utilizando para la reacción la enzima polimerasa Q5® High-Fidelity DNA y con los oligos:

248

(TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG),

249

(GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC);

posteriormente se revisó la integridad y tamaño de los amplicones de cada muestra mediante geles de agarosa al 2 %. Se buscó que el tamaño del amplicon fuese de ~ 500 pb, correspondiente a las regiones hipervariables amplificadas. Posteriormente, se recuperaron las bandas y se purificaron con perlas *AMPure XP*. Se prepararon las librerías de acuerdo al protocolo de *Illumina* para poder realizar la secuenciación *paired end* mediante la plataforma de *Illumina MiSeq 2x250*, lo que generó dos lecturas por muestra: R1 y R2, cada una en archivos “*fastq*” para cubrir la totalidad del amplicón con una longitud de 251 bases para cada una de las lecturas, tanto R1 como R2 (Tabla 4).

#### 4.5 Pre-procesamiento de las secuencias

Cada una de las lecturas se sometió a un tratamiento para asegurar su calidad. Debido a que las lecturas generadas no cuentan con la sección *overhang* de *Illumina MiSeq*, únicamente fue necesario remover los *primers* específicos para V3-V4 (Tabla 4). Usando el comando “*HEADCROP*” de *Trimmomatic* (Bolger *et al.*, 2014) se removieron las primeras 17 bases de las lecturas R1 y las primeras 21 de R2, esto para remover la sección de la lectura correspondiente a los *primers*.

Tabla 5. Oligos utilizados por secciones. Las lecturas generadas por el sistema *Illumina MiSeq*, usualmente no cuentan con la secuencia “*overhang*”

Id	Secuencia “ <i>overhang</i> ” de <i>Illumina MiSeq</i>	Secuencia específica V3-V4
248 (F)	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	CCTACGGGNGGCWGCAG
249 (R)	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	GACTACHVGGGTATCTAATCC

Posteriormente se realizó el corte de las lecturas con el comando “*CROP*” también de *Trimmomatic* para que las lecturas quedaran a una longitud de 230 bases para R1, y 231 bases para R2. Posteriormente se unieron ambas lecturas (R1 y R2) de cada muestra, usando *fastq-join* (Aronesty, 2013), para obtener amplicones con una longitud máxima de 455 bases los cuales se sometieron a un filtro de calidad, para lo cual se utilizó un filtrado por ventanas de 6 bases tomando en cuenta una calidad mínima de 20 (Q20), la cual según el formato de *Phred Quality Score* tiene un 99% de exactitud al asignar una base, para éste filtro de calidad, se utilizó el comando “*SLIDINGWINDOW*”, también de *Trimmomatic*.

#### 4.6 Generando la tabla *BIOM*

Las librerías en formato *fastq* se convirtieron a formato *fasta*, y se generó una tabla en formato *BIOM* (Del inglés: *Biological Observation Matrix*), la cual en esencia es una tabla de contingencia en un formato que puede ser reconocido por el *software Qiime* (Del inglés: *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). Posteriormente, con *Qiime 1.9.1* (Caporaso *et al.*, 2010), y utilizando como referencia la base de datos de *Green Genes 13.8* para 16s rRNA, que se denominó “*raw BIOM*”. Se eligió *Green Genes 13.8* debido a que se ha reportado que es la más adecuada para evaluar la microbiota del camarón blanco del pacífico, en comparación con RDP (Del inglés: *Ribosomal Database Project*) o Silva (Gallardo L, 2018). De la tabla “*raw BIOM*”, se removieron primeramente los *OTUs* singletones (*OTUs* que están representados solamente por una lectura), y posteriormente se removieron aquellos *OTUs* con una frecuencia relativa menor a 0.00005 (0.005 %), esto para remover *OTUs* transitorios (Bokulich *et al*, 2013). A la tabla *BIOM* generada se le aplicó un filtro con la finalidad de reducir la dispersión de datos, de acuerdo a los siguientes criterios:

1. Para que un *OTU* sea conservado, debe aparecer en más del 50% de las muestras de algún tratamiento.
2. Aquellos *OTUs* que no cumplan el criterio anterior, deben tener una frecuencia relativa igual o mayor al 0.01 (1%) para ser retenido.

La tabla resultante del tratamiento para reducir la dispersión de los datos se le denominó “tabla *Biom\_R*” (Figura 17).

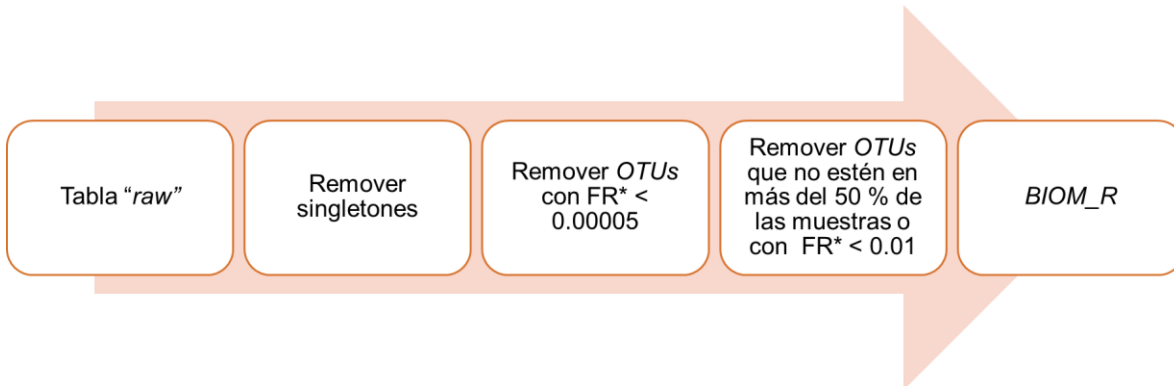


Figura 17. Diagrama de flujo para generar la tabla *Biom\_R*.

#### 4.7 Asignación taxonómica

A partir de la tabla *BIOM\_R* generada se realizó la asignación taxonómica, a nivel de fila, clase, orden, familia, género y especie, con *Qiime 1.9.1*, utilizando el comando “*summarize\_taxa\_through\_plots.py*”. Posteriormente se realizó el análisis discriminante lineal, *LEfSe* (Segata et al, 2011), para evaluar los grupos taxonómicos que son significativamente abundantes entre los distintos tratamientos, esto para cada uno de los niveles taxonómicos.

#### 4.8 Análisis de diversidad $\alpha$ y $\beta$

Los análisis de diversidad  $\alpha$  se realizaron a partir de la tabla *Biom\_R* con el comando “*alpha\_rarefaction.py*” en *Qiime 1.9.1*, los cuales fueron el Índice de *Shannon* y diversidad filogenética *PD* (del inglés: *Phylogenetic diversity*), para conocer la diversidad y homogeneidad de los *OTUs* en tratamientos respectivamente. *Chao1* y *OTUs* observados para estimar la riqueza de *OTUs* en los tratamientos; esto se realizó a una profundidad de 4321 lecturas y con 10,000 iteraciones; esto, para evitar un sesgo por las diferentes profundidades de lecturas en cada muestra, los valores obtenidos de los análisis de las métricas *Shannon*, *PD*, *Chao1* y *OTUs* observados, se evaluaron estadísticamente mediante una *t-test*, para determinar si existe una diferencia significativa entre los tratamientos.

Para la diversidad  $\beta$  se utilizaron las métricas de *UniFrac: unweighted* y *weighted*. Se realizaron a partir de la tabla *Biom\_R*, en *Qiime 1.9.1*, utilizando el



comando “*beta\_diversity\_through\_plots.py*”, para la comparación de las comunidades microbianas en función de su tratamiento, independientemente del órgano a una profundidad de 4321 lecturas. Posteriormente se realizó la diversidad  $\beta$  de las comunidades microbianas en cada órgano, tanto para los hepatopáncreas como para el intestino por separado, la cual se realizó con una profundidad de secuencias de 4623 y 4321 que representa el 75 % de la librería con más de 5000 lecturas respectivamente. Las matrices de distancia generadas en cada análisis de diversidad  $\beta$  se utilizaron para determinar el valor R, mediante una prueba *ANOSIM* (Del inglés: *Analysis Of Similarity*), tal valor permite determinar la diferencia entre los grupos, a partir de las matrices de distancia generadas, y representado por un valor que puede ir de 0 a 1, siendo 0 para una diferencia nula, y 1, que indica que los grupos son diferentes. Posteriormente se realizaron las gráficas de Análisis de Coordinadas Principales PCoA (Del inglés: *Principal Coordinates Analysis*).

#### **4.9 Análisis de presencia y abundancia de probióticos**

Para conocer si la adición de agavina promueve el enriquecimiento, o favorece la presencia de bacterias probióticas, se realizó una búsqueda en *Scopus* (Tabla 5) de las especies probióticas previamente reportadas en camarón, de tal búsqueda, se encontrando 80 especies reportadas. Posteriormente, se generó una nueva tabla para la búsqueda de bacterias probióticos en los órganos de los camarones. En esta ocasión, se llevó a cabo la asignación de *OTUs*, con la base de datos de Silva132 como referencia, con un nivel de identidad de 97 %, ya que se encontró que en esta base de datos se encuentra un mayor número de especies probióticas en comparación con *Green genes 13.8*. Estando presentes 70 especies de las 80 en Silva132, mientras que en *Green genes*, solamente aparecen 28 de las 80 (Anexo 6). A partir de la tabla *BIOM* generada, se asignó la taxonomía a nivel de especie con *Qiime 1.9.1*, utilizando el comando “*summarize\_taxa\_through\_plots.py*”. Se realizaron pruebas de Wilcoxon entre cada dieta experimental contra la dieta basal para determinar si hay diferencia significativa entre las especies.

Tabla 6. Términos utilizados para la búsqueda en Scopus de estudios que evalúan el efecto probiótico de distintas bacterias

Litopenaeus Bacteria Commensal	Penaeus Bacterial Commensal	Prawn Microbial Probiotic
Litopenaeus Bacteria Probiotic	Penaeus Bacterial Probiotic	Prawn Microbial Commensal
Litopenaeus Bacteria Probiotic	Penaeus Bacterial Probiotic	Prawn Microbial Probiotic
Litopenaeus Bacterial Commensal	Penaeus Microbial Probiotic	Shrimp Bacteria Commensal
Litopenaeus Bacterial Probiotic	Penaeus Microbial Commensal	Shrimp Bacteria Probiotic
Litopenaeus Bacterial Probiotic	Penaeus Microbial Probiotic	Shrimp Bacteria Probiotic
Litopenaeus Microbial Probiotic	Prawn Bacteria Commensal	Shrimp Bacterial Commensal
Litopenaeus Microbial Commensal	Prawn Bacteria Probiotic	Shrimp Bacterial Probiotic
Litopenaeus Microbial Probiotic	Prawn Bacteria Probiotic	Shrimp Bacterial Probiotic
Penaeus Bacteria Commensal	Prawn Bacterial Commensal	Shrimp Microbial Probiotic
Penaeus Bacteria Probiotic	Prawn Bacterial Probiotic	Shrimp Microbial Commensal
Penaeus Bacteria Probiotic	Prawn Bacterial Probiotic	Shrimp Microbial Probiotic

## 5. Resultados

### 5.1 Resultados de los parámetros físico-químicos

Los parámetros del agua del estanque se midieron dos veces al día, durante la mañana, a las 5 HRS y durante la tarde, a las 18 HRS. Se determinaron: pH, salinidad, temperatura y oxígeno disuelto (OD) (Tabla 6).

Tabla 7. Promedio  $\pm$  S.D. de los parámetros fisicoquímicos del agua

Temperatura (°C)	OD (mg/Lt)	pH	Salinidad (ppm)
29.96 $\pm$ 1.28	4.40 $\pm$ 0.50	7.69 $\pm$ 0.25	44.85 $\pm$ 0.74

### 5.2 Evaluación del rendimiento en el crecimiento del *L. vannamei*

Las distintas métricas aplicadas señalan que el mejor resultado de ganancia de biomasa con respecto al alimento lo muestran los camarones del grupo A2, con un mejor rendimiento (FCA) en su crecimiento (Tabla 7).

A pesar de que el crecimiento, representado como PG, no fue significativamente diferente entre las distintas dietas, se observó una tendencia hacia una mayor ganancia de peso en los camarones alimentados con la dieta experimental suplementada con agavina. Interesantemente, se pudo apreciar que el consumo de alimento (ATI) en el grupo A2, fue significativamente menor con respecto al grupo DB. El grupo A10 mostró un consumo mayor de alimento, a pesar de que su crecimiento fue estadísticamente similar al grupo DB, esto explica que su rendimiento haya sido el peor.

Los valores obtenidos del análisis de TEP, determina que el grupo A2 retuvo cerca del 50% de la proteína suministrada en el alimento, lo cual es significativamente mayor comparado con el grupo DB, mientras que, en este último, y en la dieta suplementada con agavina al 10% fue prácticamente similar. En cuanto a los valores obtenidos del análisis TEC, a pesar de no mostrar diferencia significativa entre los grupos alimentados con una dieta suplementada con agavina, con respecto al grupo DB, el resultado final fue mayor para el grupo A2, lo que

implica que el peso ganado diariamente, por los camarones del grupo A2, fue ligeramente superior. El CTC permite evaluar el papel de la temperatura en el crecimiento de los camarones; los resultados obtenidos fueron prácticamente similares para todos los grupos, lo que permite descartar alguna influencia de la temperatura en el crecimiento de alguno de los grupos.

Tabla 8. Evaluación de los parámetros de rendimiento e ingesta de alimento de *L. vannamei* al ser alimentado con dietas suplementadas con distintas concentraciones de agavina como prebiótico

Parámetros	DB	A2	A10	DB vs A2	DB vs A10
PI (g)	10.80 ± 0.09	10.90 ± 0.44	11.27 ± 0.20	0.684	0.093
PF (g)	12.87 ± 0.71	13.60 ± 0.42	13.92 ± 0.50	0.158	0.059
PG (g)	2.07 ± 0.79	2.70 ± 0.19	2.66 ± 0.56	0.22	0.25
PPG (%)	19.20 ± 7.45	24.81 ± 2.24	23.62 ± 5.25	0.25	0.35
FCA	2.50 ± 0.50	1.18 ± 0.03	2.64 ± 0.18	<b>0.0019</b>	0.5823
ATI (g)	31.86 ± 5.33	16.10 ± 0.87	36.632 ± 1.10	<b>0.00091</b>	0.11601
TEP	0.19 ± 0.10	0.46 ± 0.04	0.20 ± 0.05	<b>0.0024</b>	0.8202
TEC (g día <sup>-1</sup> )	0.65 ± 0.24	0.82 ± 0.07	0.78 ± 0.16	0.25	0.35
CTC (g día <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup> )	0.02 ± 0.006	0.021 ± 0.002	0.020 ± 0.004	0.24	0.32

Los valores representan los promedios ± S.D. de tres tratamientos con tres réplicas (n=9). Los valores en la columna DB vs A2 representan el p-value de la prueba t-test entre el grupo alimentado con la dieta basal y el grupo alimentado con la dieta suplementada con agavina al 2%; los valores en la columna DB vs A10 representan el p-value de la prueba t-test entre el grupo alimentado con la dieta basal y el grupo alimentado con la dieta suplementada con agavina al 10%. Peso inicial (PI), Peso final (PF), Peso ganado (PG), Porcentaje de peso ganado (PPG), Factor de conversión alimenticia (FCA), Alimento total ingerido (ATI), Tasa de eficiencia proteica (TEP), Tasa específica de crecimiento (TEC), Coeficiente térmico de crecimiento (CTC)

### 5.3 Análisis de las secuencias

Para el análisis de la microbiota, se secuenció la región V3-V4 del gen ribosomal 16s rRNA del DNA extraído tanto de los hepatopáncreas como de los intestinos por separado. Se tomaron tres hepatopáncreas y tres intestinos de cada jaula y para cada uno de los tres tratamientos, después de la extracción de DNA, amplificación y purificación, se generaron 72 librerías: 12 correspondientes a los hepatopáncreas del grupo DB, 12 correspondientes a los hepatopáncreas del grupo A2, y 12 correspondientes a los hepatopáncreas del grupo A10. De igual forma para los intestinos.

Como resultado de un análisis de diversidad beta preliminar, en el que se pudo apreciar una clara diferencia en la estructura de la microbiota, tanto en su composición como en la abundancia de *OTUs*, de una de las muestras correspondiente al hepatopáncreas de un camarón del grupo A10 (10-3H4), con respecto al resto de las muestras de dicho grupo, se decidió excluir dicha muestra para todos los análisis (Anexo 1).

La secuenciación de las regiones hipervariables V3-V4, del gen 16s rRNA de las 71 librerías dio como resultado 3,358,925 lecturas, con un promedio de  $47,308.80 \pm 30,328.46$  (Anexo 2). Posteriormente, se retiraron los “*primers*” y se cortaron las secuencias para tener una longitud de 230 bases para R1 y 231 bases para R2, en seguida se unieron las secuencias complementarias R1 y R2, esto para cada una de las 71 librerías, dando como resultado 2,587,212 amplicones completos con un promedio de  $36,439.61 \pm 26,546.15$ . Después de asegurar la calidad, quedaron 2,582,697 amplicones completos con la calidad asegurada ( $Q > 20$ ) en las 71 librerías. Con un promedio de  $36,376.01 \pm 26,506.94$  (Anexo 2).

#### **5.4 Construcción de la tabla *BIOM***

Una vez que se aseguró la calidad de las librerías, se realizó la asignación de *OTUs* para generar la tabla *BIOM*, utilizando como referencia *Green genes 13.8* al 97% de identidad.

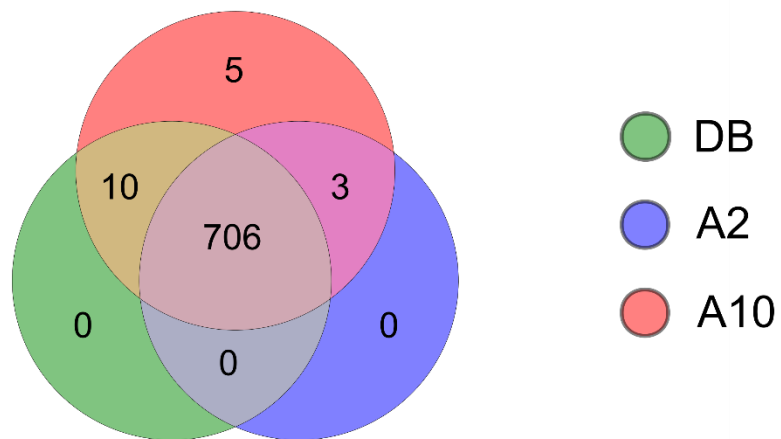
En total, 1,813,345 lecturas se asignaron a 14,130 *OTUs* para las 71 librerías, con un promedio de  $25,540.07 \pm 19,203.94$  lecturas se asignadas. Después de remover *singletons*, *OTUs* con frecuencia relativa menor al 0.005 %, y el filtro para remover la dispersión de los datos, como se especifica en la sección de materiales y métodos, quedaron un total de 1,693,111 de lecturas asignadas a 724 *OTUs* para las 71 librerías, con un promedio de  $23,846.63 \pm 17,873.37$ .

De estos *OTUs* asignados, la mayoría son compartidos entre tratamientos, independientemente del órgano (Figura 18. A), con 706 (97.5 %) *OTUs* compartidos entre los grupos DB, A2 y A10. Mientras que la minoría de *OTUs* son compartidos

entre dos tratamientos, por ejemplo 10 *OTUs* (1.4 %) son compartidos entre los grupos DB y A10 y 3 *OTUs* (0.4 %) entre A2 y A10. Solamente el grupo A10 cuenta con 5 *OTUs* (0.7 %) únicos.

Con respecto a las muestras correspondientes a los hepatopáncreas (Figura 18. B), 713 *OTUs* fueron asignados, de los cuales, la mayoría se compartieron entre los tres tratamientos, con 621 *OTUs* (87.1 %). El número de *OTUs* compartidos entre el grupo DB y A10 es 42 (5.9 %), entre los grupos DB y A2, se compartieron 14 *OTUs* (2 %) y entre los grupos A2 y A10 12 (1.7 %). Como en el caso anterior, no existieron *OTUs* compartidos específicamente entre los grupos DB y A2. Se encontraron 5 *OTUs* (0.7 %) únicos para los hepatopáncreas del grupo A10. En el caso de los *OTUs* asignados en los intestinos (Figura 18. C), se encontraron 709 *OTUs* en total en este órgano. El grupo DB presentó solamente un *OTU* único (0.1 %); A2, 2 *OTUs* únicos (0.3 %) y A10 presentó el mayor número de *OTUs* únicos con 10 (1.4 %). Se encontró que el grupo DB comparte 1 (0.1 %) y 7 (1 %) *OTUs* con los grupos A2 y A10, respectivamente, mientras que estos dos últimos comparten 11 (1.6%) *OTUs*. Como en los casos anteriores, la mayoría de los *OTUs* se comparten entre todos los grupos, con un total de 677 (95.5 %) *OTUs* compartidos.

## Tratamiento



## Hepatopáncreas



## Intestino

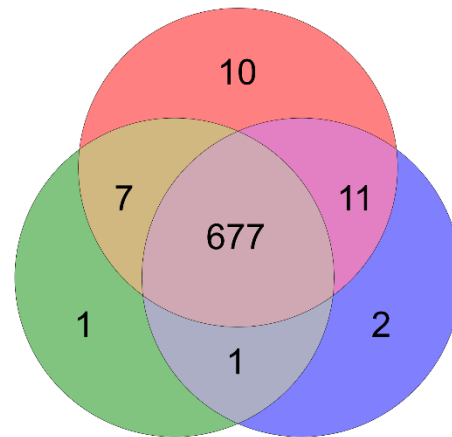


Figura 18. Diagrama de Venn que muestra los OTUs únicos y compartidos entre dietas experimentales. A) OTUs únicos y compartidos entre dietas experimentales independientemente del órgano. B) OTUs únicos y compartidos entre dietas experimentales en los hepatopáncreas. C) OTUs únicos y compartidos entre dietas experimentales en los intestinos.

Se generó adicionalmente una tabla *BIOM*, rarefaccionada a 1000 iteraciones en cada una de las cuales, se tomaron lecturas al azar. El número de lecturas que se tomaron para cada iteración se ajustó para que fuese igual a 5000. A partir de la tabla *BIOM* homologada se hicieron los análisis de diversidad alfa y beta. Se apreció que los resultados presentan la misma tendencia que al hacerlos

con una tabla *BIOM* sin homogenizar las muestras, sin embargo, todos los resultados de las distintas métricas de la diversidad alfa fueron menores, así como el valor de R en los análisis de la diversidad beta. Esto nos indica que una tabla rarefaccionada causa una pérdida de las particularidades propias de cada librería, por lo que se optó por realizar los análisis con la tabla *BIOM* con las librerías con su profundidad completa y solo rarefaccionar para realizar los análisis de alfa y beta diversidad (Anexo 3 y 4).

## 5.5 Diversidad alfa en tratamientos

Los análisis de diversidad alfa correspondiente a los tratamientos se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Diversidad alfa de cada una de las tres dietas

	DB	A2	A10	DB vs A2	DB vs A10
Chao1	388.73 ± 89.69	353.40 ± 87.78	412.65 ± 92.81	0.23	0.41
OTUs observados	281.26 ± 85.36	230.81 ± 72.68	297.07 ± 80.54	0.056	0.539
DF	22.37 ± 5.29	19.02 ± 4.78	23.38 ± 4.93	<b>0.0433</b>	0.5325
Shannon	5.04 ± 1.13	4.24 ± 0.86	5.30 ± 0.96	<b>0.015</b>	0.409

Los valores representan el promedio ± S.D. de cada uno de los tres grupos experimentales (n = 59, , 12 muestras de 71, quedaron fuera del análisis por tener una profundidad menor a 4321). Los valores en DB vs A2 representan el p-value de la prueba t-test entre el grupo alimentado con una dieta basal y el grupo alimentado con una dieta suplementada con agavina al 2 %. Los valores en DB vs A10 representan el p-value de la prueba t-test entre el grupo alimentado con una dieta basal y el grupo alimentado con una dieta suplementada con agavina al 10 %

Los resultados que nos permite estimar la riqueza de *OTUs* en los tratamientos, permitió determinar que no hay una diferencia significativa entre las dietas aplicadas, con un valor de Chao1 de 412.65 ± 92.81, 388.73 ± 89.69 y 353.40 ± 87.78 para los camarones del grupo A10, grupo DB y grupo A2, respectivamente. Cabe destacar que la riqueza de *OTUs* observados muestra que el grupo A10 es ligeramente superior, aunque no estadísticamente significativa con respecto al grupo DB, y de igual manera este último con respecto al grupo A2, con valores de 297.07 ± 80.54, 281.26 ± 85.36 y 230.81 ± 72.68 respectivamente.



El análisis de diversidad filogenética (DF), reveló que, al igual que con los índices de riqueza, tampoco hubo diferencia significativa entre los grupos A10 y DB, con los valores de  $23.38 \pm 4.93$  y  $22.37 \pm 5.29$ , respectivamente. Aunado a lo anterior, se pudo observar un descenso significativo con respecto a DB en el valor obtenido por el grupo A2 con un valor de  $19.02 \pm 4.78$ .

Respecto al índice de Shannon, se pudo observar que el valor obtenido por el grupo A10 fue el mayor, con un valor de  $5.30 \pm 0.96$ , aunque no de manera significativa con respecto al grupo DB, teniendo un valor de  $5.04 \pm 1.13$ . Cabe remarcar que el grupo A2 mostró un valor de  $4.24 \pm 0.86$ , significativamente menor con respecto al grupo DB.

Estos resultados indican un posible efecto dependiente de la concentración de agavina en el alimento de los camarones al modular la diversidad de la microbiota, como lo indican los índices de diversidad, ya que una concentración del 2 % de agavina en el alimento, causa una reducción significativa de la diversidad independientemente del órgano, mientras que a una concentración del 10 % no muestra un efecto significativo en ninguno de los índices de la diversidad alfa. A pesar de esto, en el caso del grupo A10, pareciera haber una tendencia hacia una mayor riqueza y diversidad de la microbiota con respecto al grupo DB. Mientras que en el caso del grupo A2, la tendencia pareciera ser opuesta, en el caso de los índices Chao1 y *OTUs* observados. Se procedió ahora a realizar los análisis de la diversidad alfa, pero separando las muestras por los órganos a los que pertenecen (Figura 19).

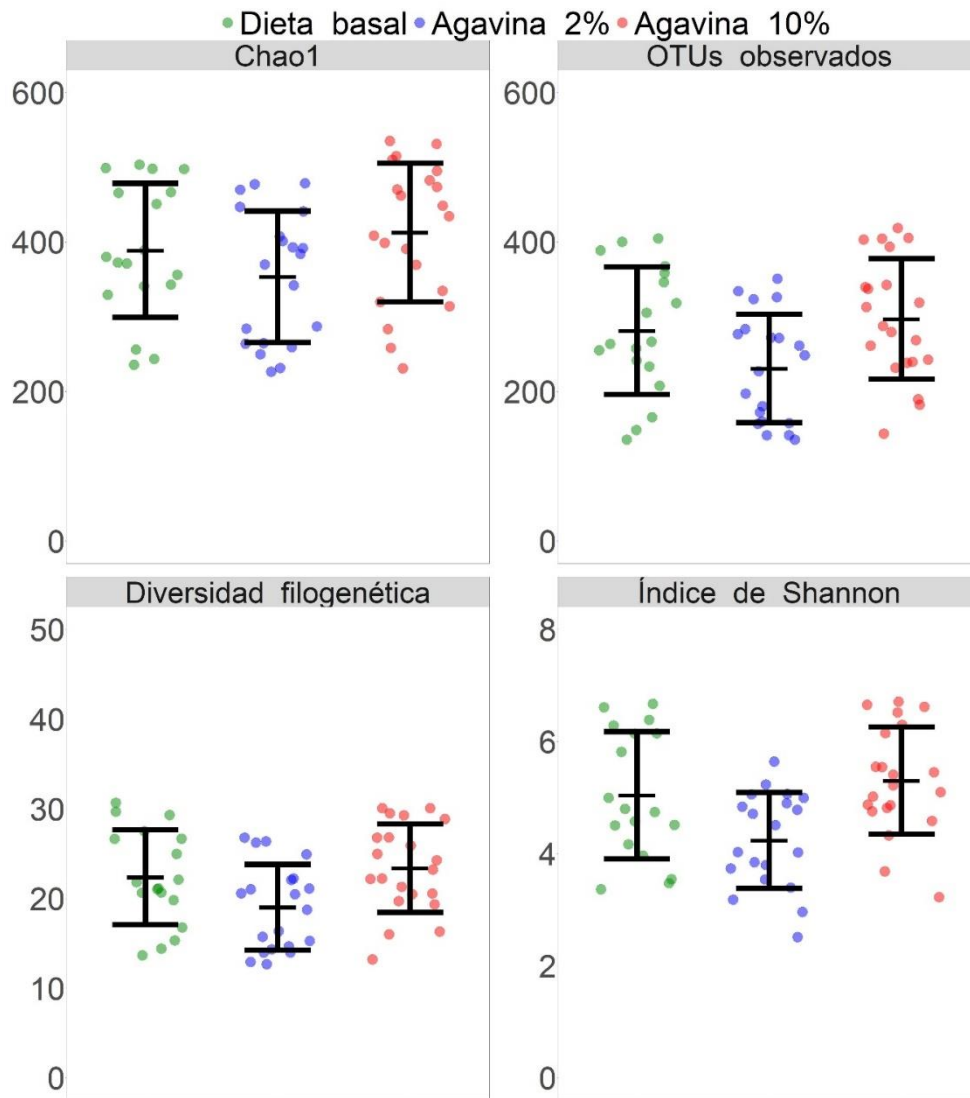


Figura 19. Gráficas que muestran el promedio y la desviación estándar de la riqueza y diversidad de OTUs por muestra a 10000 iteraciones. (Arriba a la izquierda) Índice Chao1 en cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales. (Arriba a la derecha) OTUs observados en cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales. (Abajo a la izquierda) Diversidad filogenética de cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales. (Abajo a la derecha) Índice de Shannon de cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales

## 5.6 Diversidad alfa en los hepatopáncreas

Para conocer el impacto que tienen las distintas dietas en la diversidad alfa de cada uno de los órganos, se analizaron por separado los valores de dicha diversidad (Tabla 10).

Tabla 10. Diversidad alfa en los hepatopáncreas de cada grupo alimentado con distintas dietas experimentales

	DB	A2	A10	DB vs A2	DB vs A10
Chao1	336.20 ± 89.18	315.67 ± 72.12	345.80 ± 84.81	0.62	0.81
OTUs observados	231.77 ± 85.63	197.19 ± 57.62	247.70 ± 71.88	0.35	0.65
DF	19.67 ± 5.49	16.96 ± 3.70	20.16 ± 4.53	0.25	0.83
Shannon	4.35 ± 0.99	4.04 ± 0.71	4.87 ± 0.92	0.50	0.22

Los valores representan el promedio ± S.D. de cada uno de los tres grupos experimentales ( $n = 26$ , 8 muestras de 34, quedaron fuera del análisis por tener una profundidad menor a 4623). Los valores en DB vs A2 representan el p-value de la prueba t-test entre el grupo alimentado con una dieta basal y el grupo alimentado con una dieta suplementada con agavina al 2 %. Los valores en DB vs A10 representan el p-value de la prueba t-test entre el grupo alimentado con una dieta basal y el grupo alimentado con una dieta suplementada con agavina al 10 %

En el caso de los hepatopáncreas, el grupo alimentado con la dieta suplementada con agavina al 10 % mostró valores más altos en el índice de Chao1 con un valor de  $345.80 \pm 84.8$ , seguido por el grupo DB y por último el grupo A2, con valores de  $336.20 \pm 89.18$  y  $315.67 \pm 72.12$ , respectivamente. El análisis de la riqueza de OTUs mostró un valor mayor para el grupo A10, seguido del grupo DB y, por último, el grupo A2 con valores de  $247.70 \pm 71.88$ ,  $231.77 \pm 85.63$  y  $197.19 \pm 57.62$  respectivamente.

La diversidad filogenética sigue la misma tendencia, siendo mayor para el grupo A10, seguido por el grupo DB y por último el grupo A2, con valores de  $20.16 \pm 4.53$ ,  $19.67 \pm 5.49$  y  $16.96 \pm 3.70$ , respectivamente. El resultado obtenido del análisis del índice de Shannon indica, como en el caso anterior, que no hay diferencia significativa entre los valores obtenidos de los grupos alimentados con las diferentes dietas, presentando un mayor valor para el grupo A10, seguido por el grupo DB y por último el grupo A2, con valores de  $4.87 \pm 0.92$ ,  $4.35 \pm 0.99$  y  $4.04 \pm 0.71$ , respectivamente.

Interesantemente los resultados de la diversidad alfa en los hepatopáncreas, no mostraron diferencia significativa entre los grupos alimentados con las dietas experimentales, con respecto al grupo alimentado con la dieta basal, sin embargo, puede notarse la misma tendencia dependiente de la concentración de agavina en el alimento de los camarones, al aumentar tanto la riqueza como la diversidad en el grupo A10 (Figura 20).

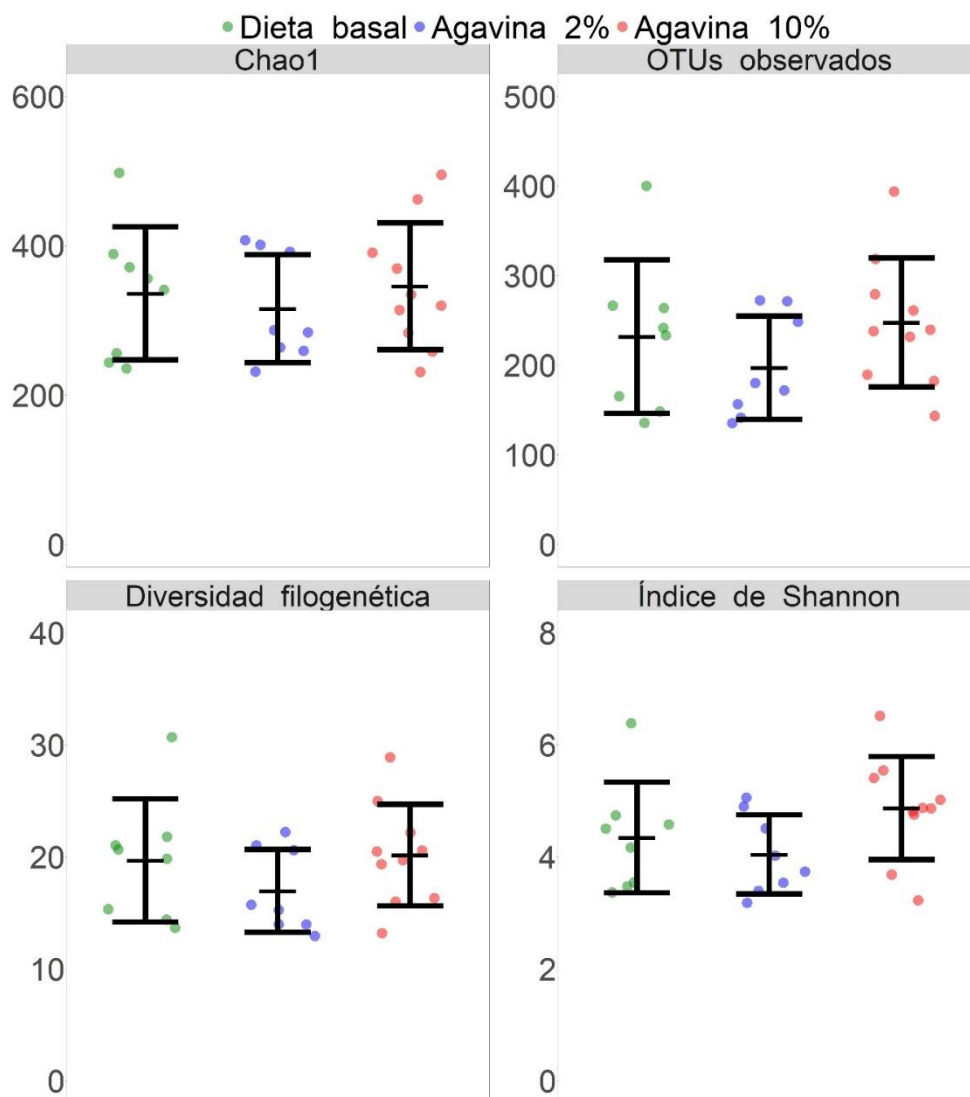


Figura 20. Gráficas que muestran el promedio y la desviación estándar de la riqueza y diversidad de OTUs por muestra a 10,000 iteraciones. (Arriba a la izquierda) Índice Chao1 en los hepatopáncreas de cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales. (Arriba a la derecha) OTUs observados en los hepatopáncreas cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales. (Abajo a la izquierda) Diversidad filogenética en los hepatopáncreas de cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales. (Abajo a la derecha) Índice de Shannon en los hepatopáncreas de cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales

## 5.7 Diversidad alfa en intestinos

Al analizar la diversidad alfa en los intestinos, se puede observar que la tendencia en los resultados es similar a los arrojados en el análisis de los hepatopáncreas.

Tabla 11. Diversidad alfa en los intestinos de cada grupo alimentado con distintas dietas experimentales

	DB	A2	A10	DB vs A2	DB vs A10
Chao1	430.75 ± 67.78	378.56 ± 90.95	473.42 ± 47.14	0.0998	0.1839
OTUs observados	320.85 ± 64.35	253.22 ± 75.12	341.94 ± 60.59	<b>0.0258</b>	0.4791
DF	24.53 ± 4.22	20.39 ± 5.07	26.31 ± 3.22	<b>0.0306</b>	0.3491
Shannon	5.59 ± 0.95	4.37 ± 0.95	5.70 ± 0.85	<b>0.0039</b>	0.8031

Los valores representan el promedio ± S.D. de cada uno de los tres grupos experimentales ( $n = 33$ , 3 muestras de 36, quedaron fuera del análisis por tener una profundidad menor a 4321). Los valores en DB vs A2 representan el p-value de la prueba t-test entre el grupo alimentado con una dieta basal y el grupo alimentado con una dieta suplementada con agavina al 2 %. Los valores en DB vs A10 representan el p-value de la prueba t-test entre el grupo alimentado con una dieta basal y el grupo alimentado con una dieta suplementada con agavina al 10 %

En el caso del índice de Chao1 el grupo alimentado con agavina al 10 % tiene el mayor valor, seguido por el de la dieta basal y, por último, el grupo alimentado con una dieta suplementada con agavina al 2 % con valores de  $473.42 \pm 47.14$ ,  $430.75 \pm 67.78$  y  $378.56 \pm 90.95$  respectivamente. Al igual que en el caso anterior, el grupo A10 tiene una mayor riqueza de OTUs, seguido por el DB, siendo este último significativamente mayor con respecto al grupo A2, con valores de  $341.94 \pm 60.59$ ,  $320.85 \pm 64.35$  y  $253.22 \pm 75.12$ , respectivamente.

El índice DF reveló que la suplementación con agavina al 2 % causó una disminución significativa con respecto al grupo DB, con valores de  $20.39 \pm 5.07$  y  $24.53 \pm 4.22$ , respectivamente, mientras que este último no mostró diferencia significativa con respecto al grupo A10, con un valor de  $26.31 \pm 3.22$ . Con respecto al índice de Shannon, el grupo A10 también mostró un valor mayor con  $5.70 \pm 0.85$ , seguido por la dieta basal con  $5.59 \pm 0.95$  y por último el grupo A2 con  $4.37 \pm 0.95$ . Como en el caso de la diversidad filogenética, también el grupo A2 presentó un índice de Shannon significativamente menor que el reportado por el grupo control.

Estos resultados, aunados con los obtenidos de la diversidad alfa en los hepatopáncreas, indican un respuesta órgano-dependiente a la suplementación

con agavina. Los resultados obtenidos de los distintos índices, indican que la concentración de agavina al 2 % en el alimento, disminuye tanto la riqueza (*OTUs* observados), como la diversidad de manera significativa en los intestinos de los camarones del grupo A2. Por tanto, el efecto de la agavina sobre la microbiota, es dependiente tanto de la concentración de la misma, como del órgano (Figura 21).

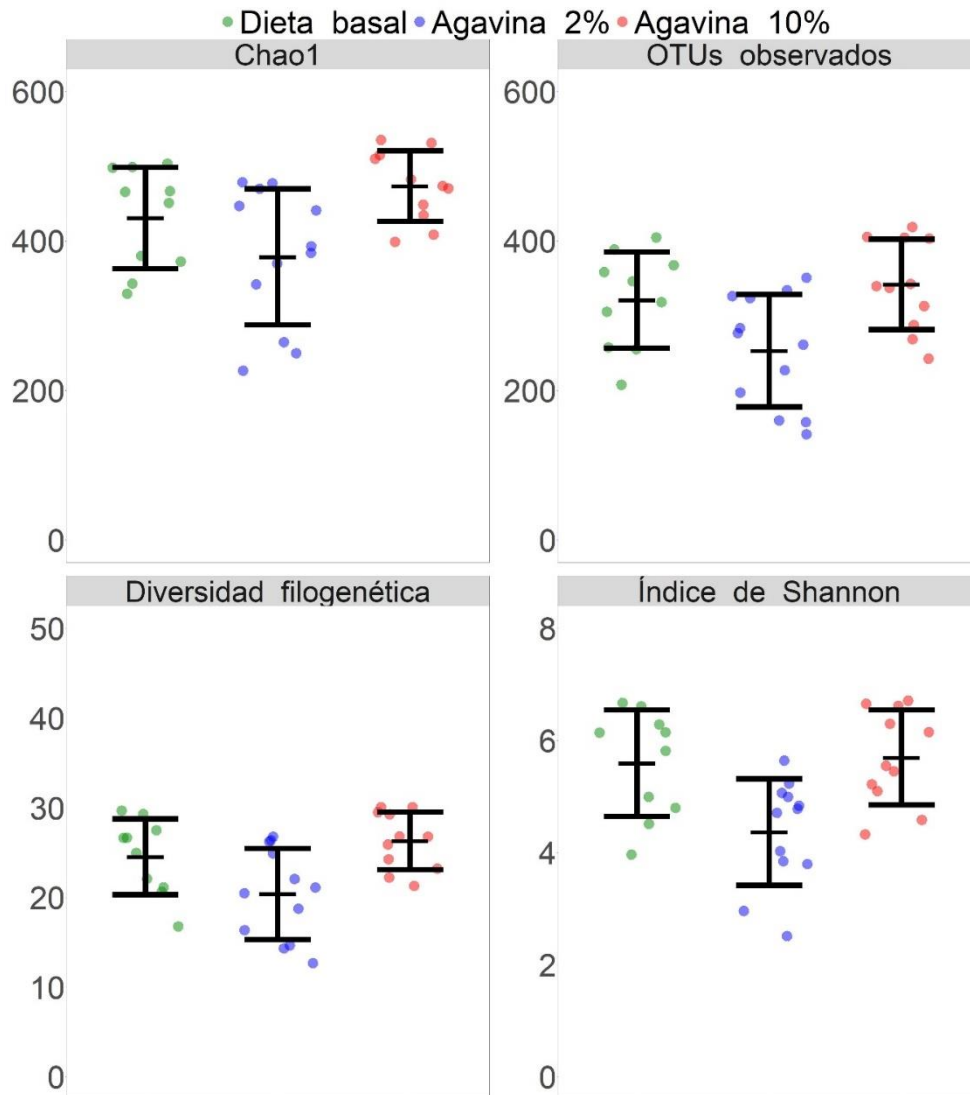


Figura 21. Gráficas que muestran el promedio y la desviación estándar de la riqueza y diversidad de OTUs por muestra a 10,000 iteraciones. (Arriba a la izquierda) Índice Chao1 en los intestinos de cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales. (Arriba a la derecha) OTUs observados en los intestinos cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales. (Abajo a la izquierda) Diversidad filogenética en los intestinos de cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales. (Abajo a la derecha) Índice de Shannon en los intestinos de cada uno de los grupos tratados con las distintas dietas experimentales.

## 5.8 Análisis de la diversidad beta

Los análisis de diversidad beta se calcularon con *UniFrac*, tanto *weighted* como *unweighted* para todas las muestras, para poder determinar el efecto que tiene el impacto tanto de las distintas dietas y de los órganos en la estructura de la microbiota (Figura 22). En los resultados de los análisis que involucran a todas las muestras, se observa que la influencia de los órganos es mayor que la de los tratamientos, como lo revela el valor R de *ANOSIM*, que indica las similitudes entre grupos, con un valor que puede ir desde el 0 al 1, siendo 0 para una diferencia nula, y 1, que indica que los grupos son diferentes, la significancia estadística del valor R, de todos los análisis *ANOSIM*, se calculó mediante 1000 iteraciones y se representa como *p-value*.

En el caso del impacto del órgano, el análisis *UniFrac unweighted* y *UniFrac weighted*, el valor R del análisis de *ANOSIM* es de 0.46 (*p-value* = 0.001) (Figura 22A) y 0.105 (*p-value* = 0.009) (Figura 22B) respectivamente. Estos resultados indican una clara influencia del órgano en los *OTUs* minoritarios, pero que, al ponderarlos por sus abundancias, vemos que la similitud entre grupos es menor.

En los resultados de los análisis que involucran a todas las muestras, agrupadas por tratamiento, el valor de R es de 0.056 (*p-value* = 0.037) (Figura 22C) y 0.102 (*p-value* = 0.004) (Figura 22D) para el análisis *UniFrac unweighted* y *UniFrac weighted* respectivamente. Esto implica que, el alimento suplementado con agavina, tiene un impacto mayor en la abundancia de los *OTUs*, como lo revela el análisis de diversidad beta *UniFrac weighted*, mientras que el impacto es menor en los *OTUs* minoritarios.

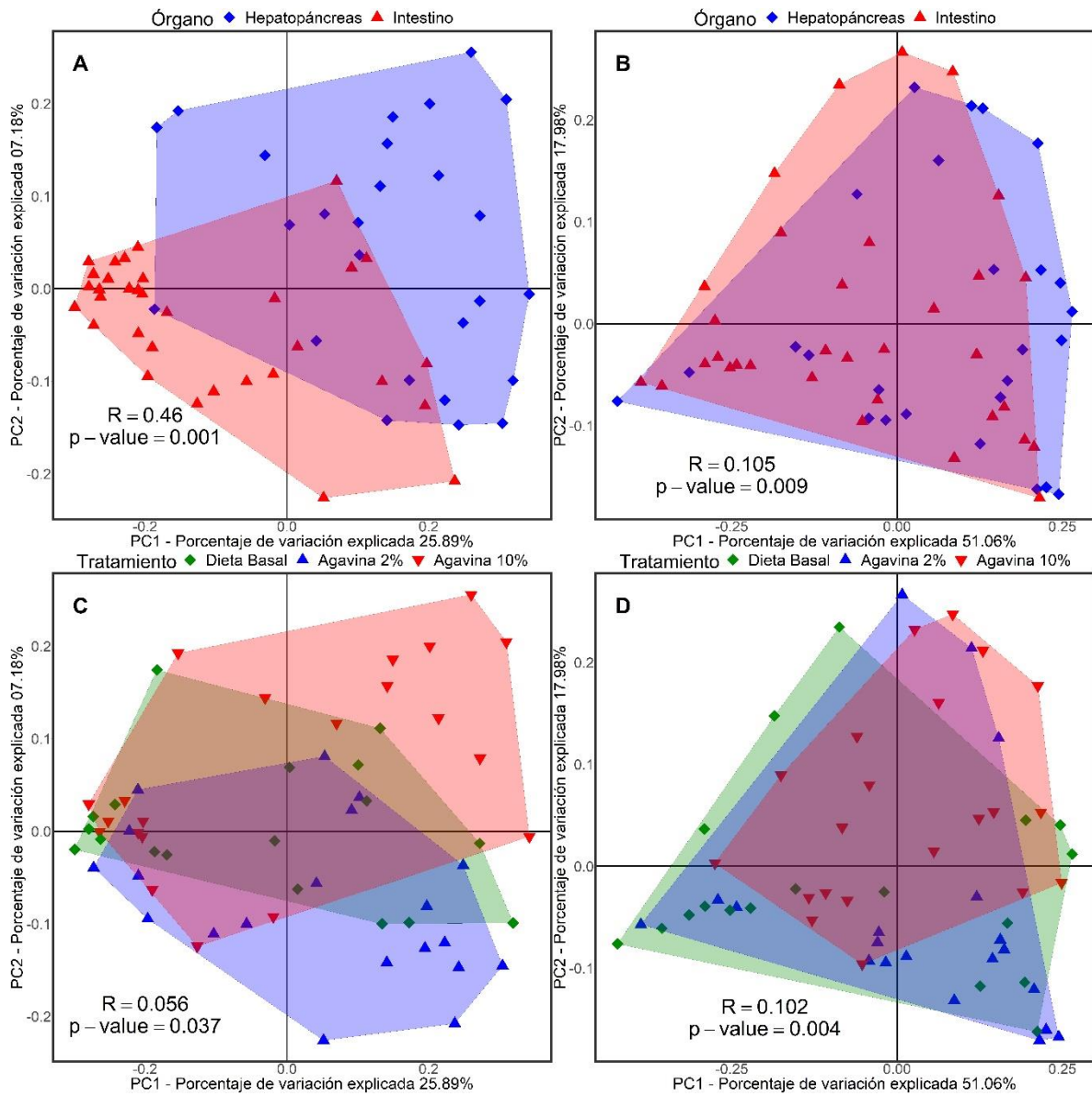


Figura 22. Los PCoAs representan la diversidad beta de la microbiota de *L. vannamei* agrupados por órganos. A) UniFrac unweighted de la microbiota de *L. vannamei* identificados por el órgano. B) UniFrac weighted de la microbiota de *L. vannamei* identificados órgano. C) UniFrac unweighted de la microbiota de *L. vannamei* identificados por dieta experimental. D) UniFrac weighted de la microbiota de *L. vannamei* identificados por dieta experimental.



## 5.9 Diversidad beta en los hepatopaneas e intestinos

Se llevó a cabo el análisis de la diversidad beta para cada órgano por separado, como se hizo con el análisis de la diversidad alfa para determinar el efecto que tienen las distintas dietas experimentales tanto en los hepatopáncreas como en los intestinos de los grupos experimentales de manera separada. En el caso de los hepatopáncreas, se puede apreciar que el valor de R de *ANOSIM* es mayor para *UniFrac unweighted* que *weighted*, con 0.352 (*p-value* = 0.001) y 0.175 (*p-value* = 0.009) respectivamente (Figura 23 A y B). Notablemente, el valor R de *ANOSIM*, obtenido por los intestinos, solamente es significativo en el caso del análisis *weighted UniFrac*, con un valor de R = 0.091 (*p-value* = 0.045). Esto indica que, en el intestino de *L. vannamei*, la adición de agavina al alimento impacta principalmente en la abundancia de los *OTUs* y no en la presencia o ausencia de los mismo (Figura 23 C y D).

En lo que respecta a los valores obtenidos por el análisis *unweighted UniFrac*, se logró observar que el efecto se vio reflejado en los hepatopáncreas y no en los intestinos. Esto sugiere que, la agavina pudiese tener una influencia mayor sobre la presencia o ausencia de *OTUs* minoritarios en los hepatopáncreas, posiblemente dependientes de la concentración de agavina, dada la separación de los grupos experimentales, mientras que, en el caso de los intestinos, a pesar de que no se obtuvo diferencia significativa en el valor R de *ANOSIM*, del análisis *unweighted UniFrac*, en el caso del análisis que pondera la abundancia, el resultado sí mostró diferencia significativa, lo que podría llegar a implicar que la adición de agavina en el alimento de *L. vannamei*, está relacionada con la variación de la abundancia de *OTUs* presentes en todos los grupos, y no necesariamente con la presencia o ausencia de *OTUs* minoritarios.

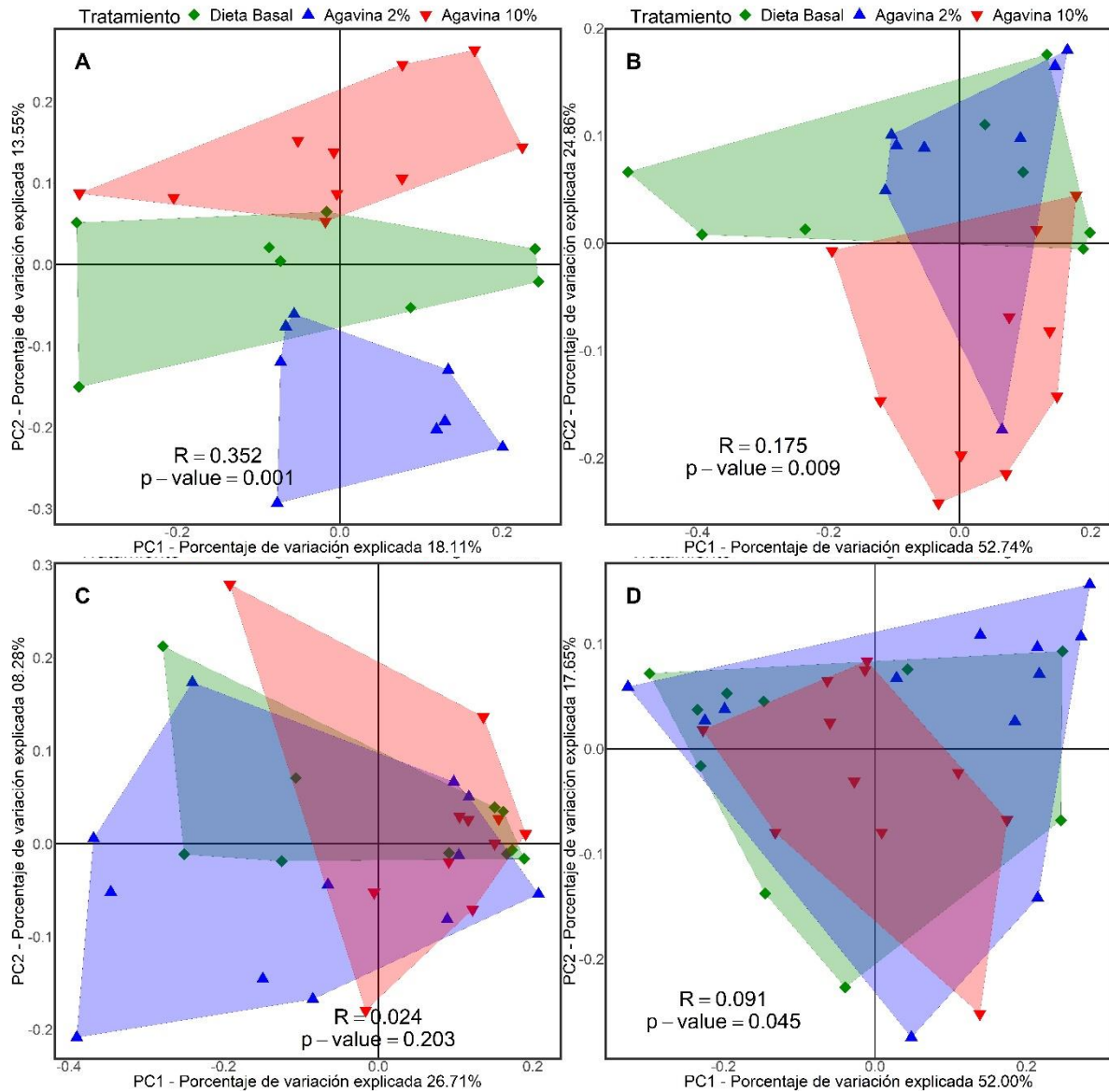


Figura 23. Los PCoAs representan la diversidad beta de la microbiota de los hepatopáncreas e intestinos de *L. vannamei*. A) UniFrac unweighted de la microbiota de los hepatopáncreas de *L. vannamei* identificados por dieta experimental. B) UniFrac weighted de la microbiota en los hepatopáncreas de *L. vannamei* identificados por dieta experimental. C) UniFrac unweighted de la microbiota en los intestinos de *L. vannamei* identificados por dieta experimental. D) UniFrac weighted de la microbiota en los intestinos de *L. vannamei* identificados por dieta experimental.

## 5.10 La adición de agavina tiene un impacto en la composición de la microbiota

El análisis de la taxonomía reveló que la suplementación con agavina tiene un efecto en la composición de la microbiota. Dado que el efecto de la dieta es órgano-dependiente se decidió analizar la taxonomía de manera separada para cada órgano.

A nivel de fila (Figura 24), *Proteobacteria* es la más abundante en los hepatopáncreas, con valores de  $65.31 \pm 17.08$  %,  $63.17 \pm 12.08$  % y  $54.18 \pm 26.36$  % para el grupo A2, seguido por el grupo A10, y siendo menos abundante en el grupo DB. En los intestinos, como en los casos anteriores, *Proteobacteria* fue la más abundante a nivel de fila, con  $60.76 \pm 24.38$  % para el grupo A2,  $54.79 \pm 11.00$  % para el grupo A10 y, por último, el grupo DB con  $49.88 \pm 19.03$  %.

*Gammaproteobacterias* fue la clase más abundante (Figura 25), tanto en los hepatopáncreas como en los intestinos de los 3 grupos. En los primeros con una abundancia de  $53.41 \pm 23.12$  %,  $52.41 \pm 14.80$  % y  $47.95 \pm 28.13$  %, para el grupo A2, A10 y DB respectivamente. En el caso de los intestinos *Gammaproteobacteria* fue más abundante en el grupo A2, con  $55.26 \pm 24.00$  %; seguido por el grupo A10, con  $42.73 \pm 11.02$  % y, por último,  $38.54 \pm 19.70$  % para el grupo DB.

En los hepatopáncreas e intestinos, *Vibrionales* fue el orden más abundante en los 3 grupos (Figura 26), siendo mayor en el grupo A2 con  $49.22 \pm 24.61$  %, seguido por el grupo DB con  $43.52 \pm 27.59$  % y por último el grupo A10 con  $42.84 \pm 16.16$  %. En los intestinos, *Vibrionales* fue más abundante en el grupo A2, seguido por el grupo A10 y por último el grupo DB, con valores de  $52.37 \pm 23.16$  %,  $37.30 \pm 12.97$  % y  $34.22 \pm 19.16$  % respectivamente.

A nivel de familia, *Pseudoalteromonadaceae* fue la más abundante, tanto en los hepatopáncreas (Figura 27), el grupo A2 presentó una mayor abundancia, seguido por el grupo DB y, por último, el grupo A10, con valores de  $43.40 \pm 25.10$  %,  $39.54 \pm 27.37$  % y  $34.90 \pm 14.12$  % respectivamente. Para los intestinos, el género *Pseudoalteromonadaceae*, fue el más abundante en los grupos DB y A10 con valores de  $26.04 \pm 19.76$  %,  $23.34 \pm 15.96$  %, respectivamente. Para los

intestinos del grupo A2, la familia Vibrionales fue más abundante, con un valor de  $29.70 \pm 28.80$  %.

Un género no asignado de *Pseudoalteromonadaceae* fue el más abundante en los hepatopáncreas de los tres tratamientos (Figura 28), siendo más abundante en el grupo A2 con  $42.85 \pm 24.78$  %, en el grupo DB es menor con  $38.59 \pm 27.28$  %, y por último el A10 con  $34.11 \pm 14.07$  %. En los intestinos de los grupos DB y A10, un género no asignado de *Pseudoalteromonadaceae* es el más abundante en los grupos DB y A10, con valores de  $24.82 \pm 19.79$  % y  $22.50 \pm 15.90$  %, respectivamente. Mientras que el género *Vibrio* resultó ser el más abundante en el grupo A2, con un valor de  $28.55 \pm 28.84$  %

Cabe mencionar que en los intestinos del grupo A2, a diferencia de los hepatopáncreas de este mismo grupo, la frecuencia acumulada de los grupos taxonómicos minoritarios (< top 20) a nivel de género, es la menor, con un valor de  $11.17 \pm 4.31$  %, seguido por el grupo A10 con  $18.62 \pm 9.54$  % e igualmente un  $18.62 \pm 11.13$  % para el grupo DB, esta disminución en de los grupos taxonómicos minoritarios de los intestinos del grupo A2, podría explicar el que haya obtenido los valores más bajos en la diversidad alfa y que su valor R de *ANOSIM*, del análisis de diversidad beta, *UniFrac weighted* (ponderando las abundancias de *OTUs*) haya sido significativamente mayor que en el *unweighted*.

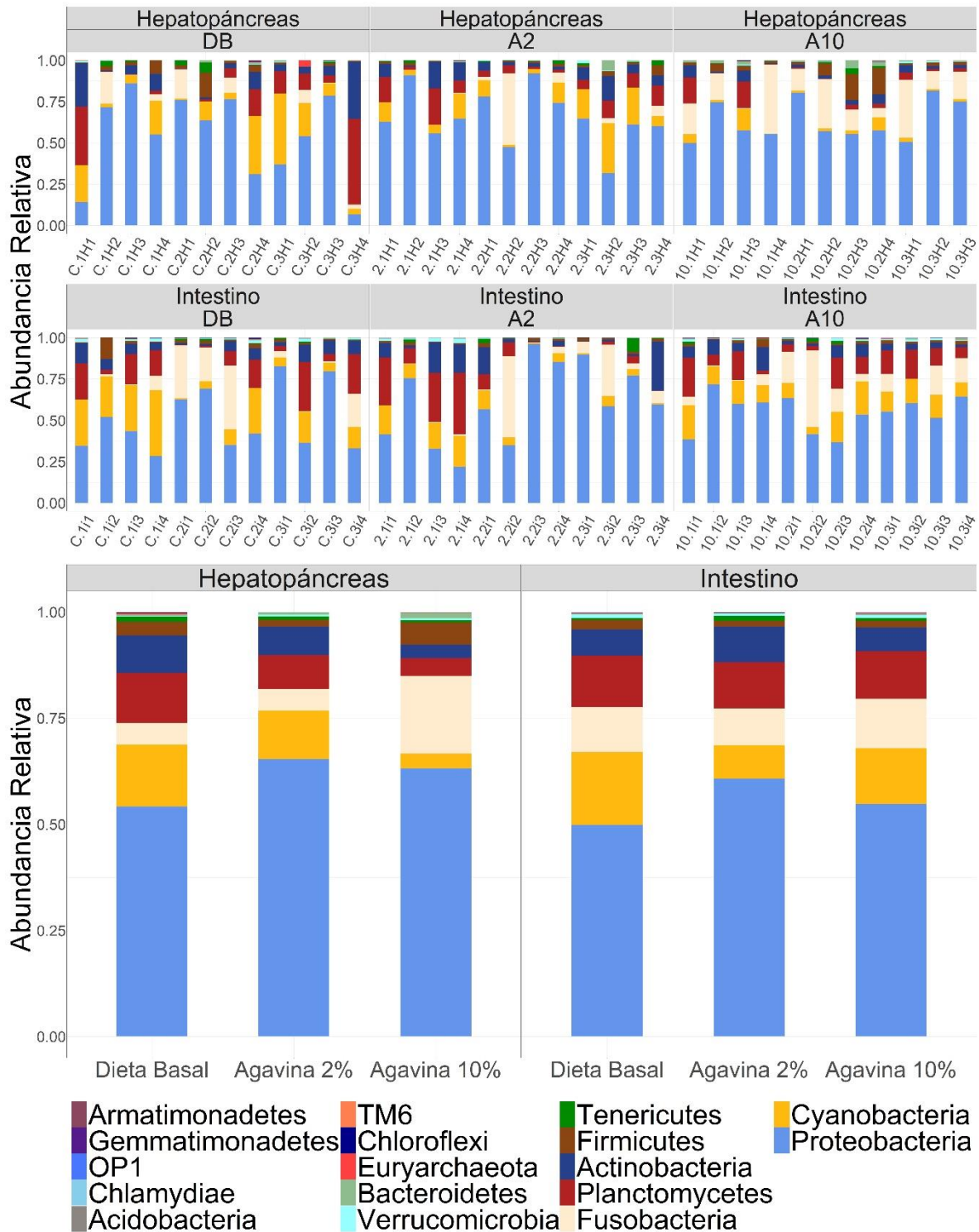


Figura 24. Abundancia relativa a nivel de fila de cada muestra (Arriba), los hepatopáncreas de cada uno de los grupos (Abajo izquierda) alimentados con las distintas dietas experimentales y los intestinos de cada uno de los grupos (Abajo izquierda) alimentados con las distintas dietas experimentales. Las filas aparecen ordenadas por abundancia.

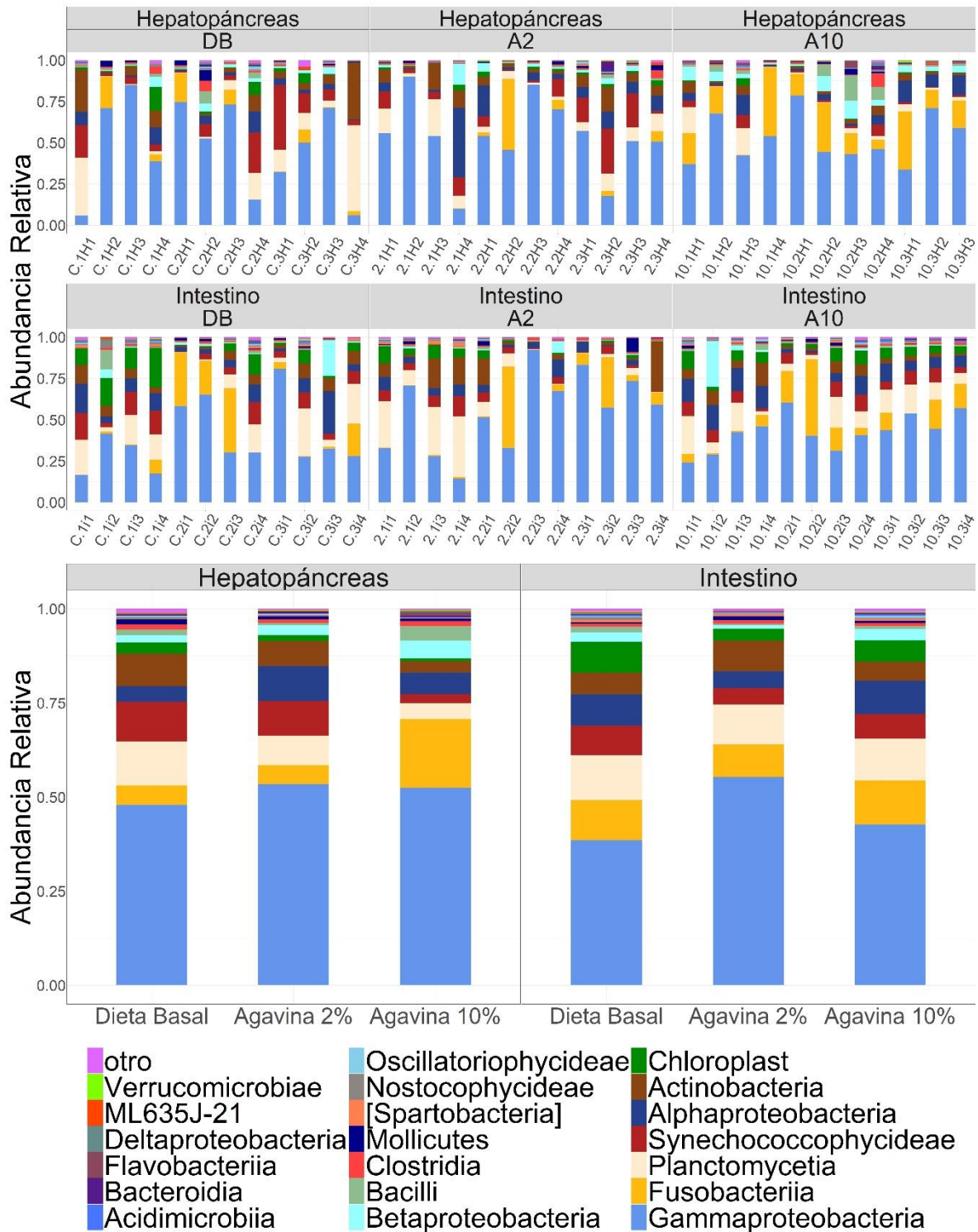


Figura 25. Abundancia relativa a nivel de clase de cada muestra (Arriba), los hepatopáncreas de cada uno de los grupos (Abajo izquierda) alimentados con las distintas dietas experimentales y los intestinos de cada uno de los grupos (Abajo derecha) alimentados con las distintas dietas experimentales. Las clases aparecen ordenadas por abundancia. Se muestra el top 20, la suma de los grupos taxonómicos restantes se muestra con la etiqueta de "Otros".

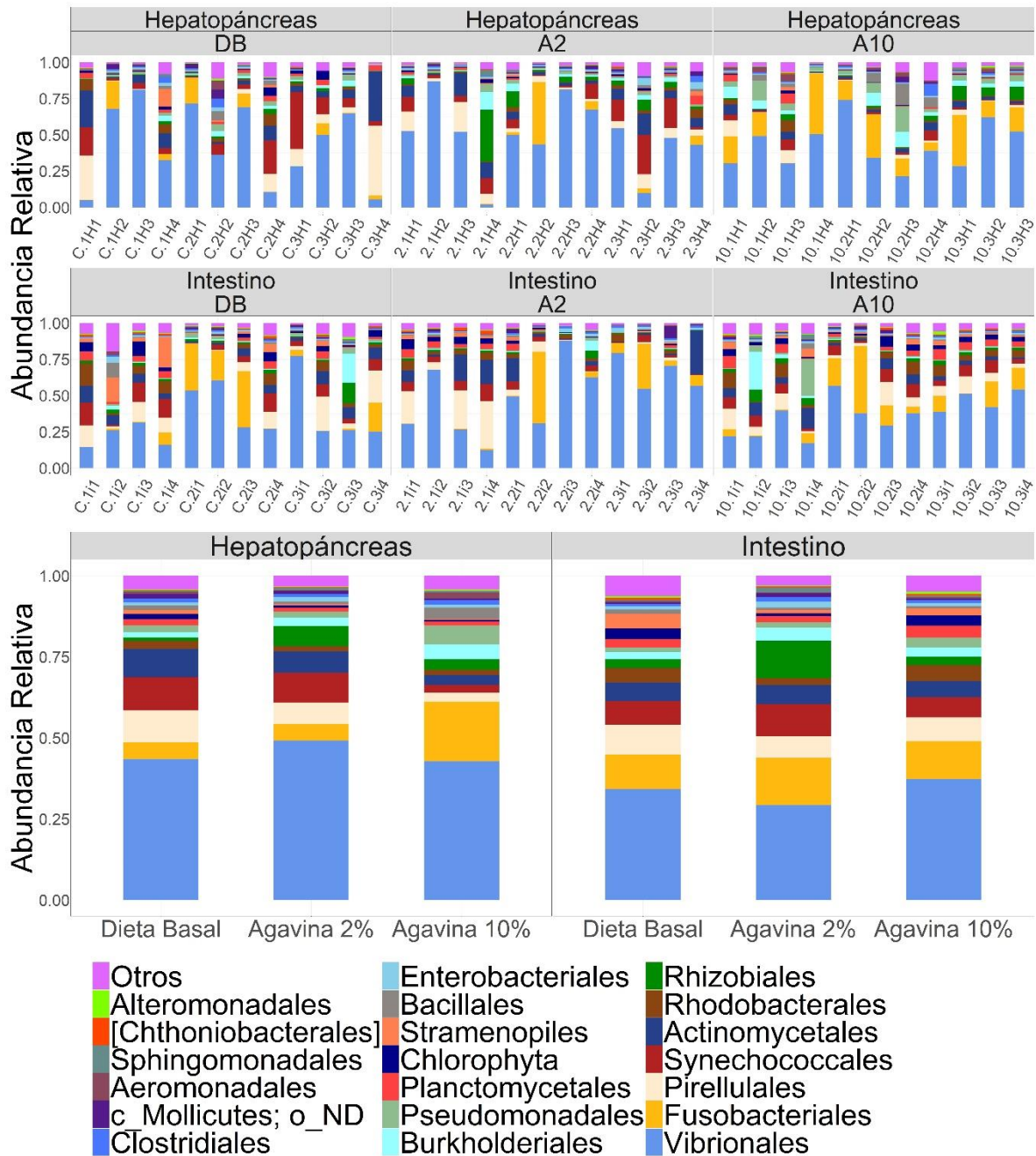


Figura 26. Abundancia relativa a nivel de orden de cada una de las muestras (Arriba) y los hepatopáncreas de cada uno de los grupos (Abajo izquierda) alimentados con las distintas dietas experimentales y los intestinos de cada uno de los grupos (Abajo derecha) alimentados con las distintas dietas experimentales. Los órdenes aparecen ordenadas por abundancia. Se muestra el top 20, la suma de los grupos taxonómicos restantes se muestra con la etiqueta de "Otros".

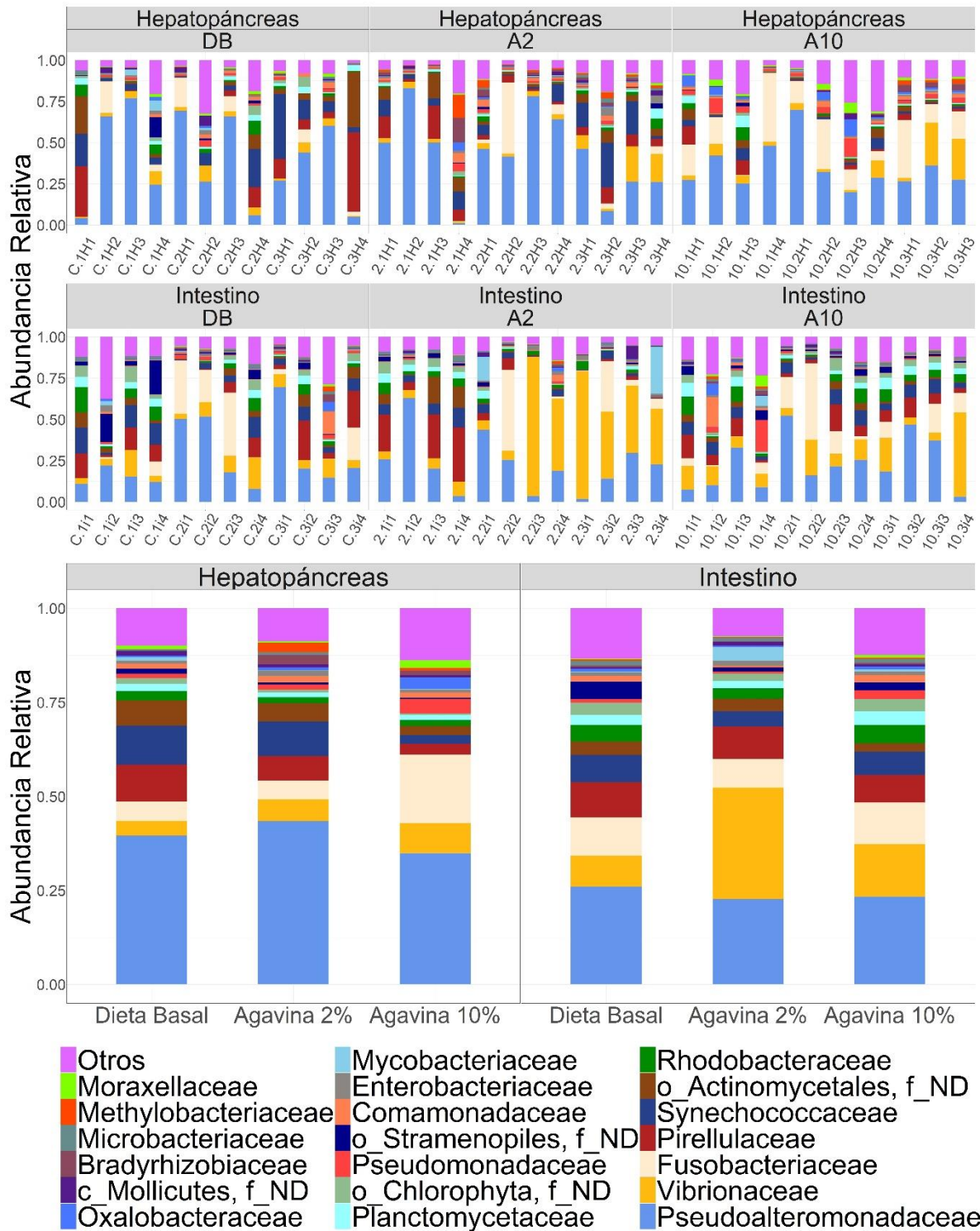


Figura 27. Abundancia relativa a nivel de familia de cada una de las muestras (Arriba) y los hepatopáncreas de cada uno de los grupos (Abajo izquierda) alimentados con las distintas dietas experimentales y los intestinos de cada uno de los grupos (Abajo derecha) alimentados con las distintas dietas experimentales. Las familias aparecen ordenadas por abundancia. Se muestra el top 20, la suma de los grupos taxonómicos restantes se muestra con la etiqueta de "Otros".



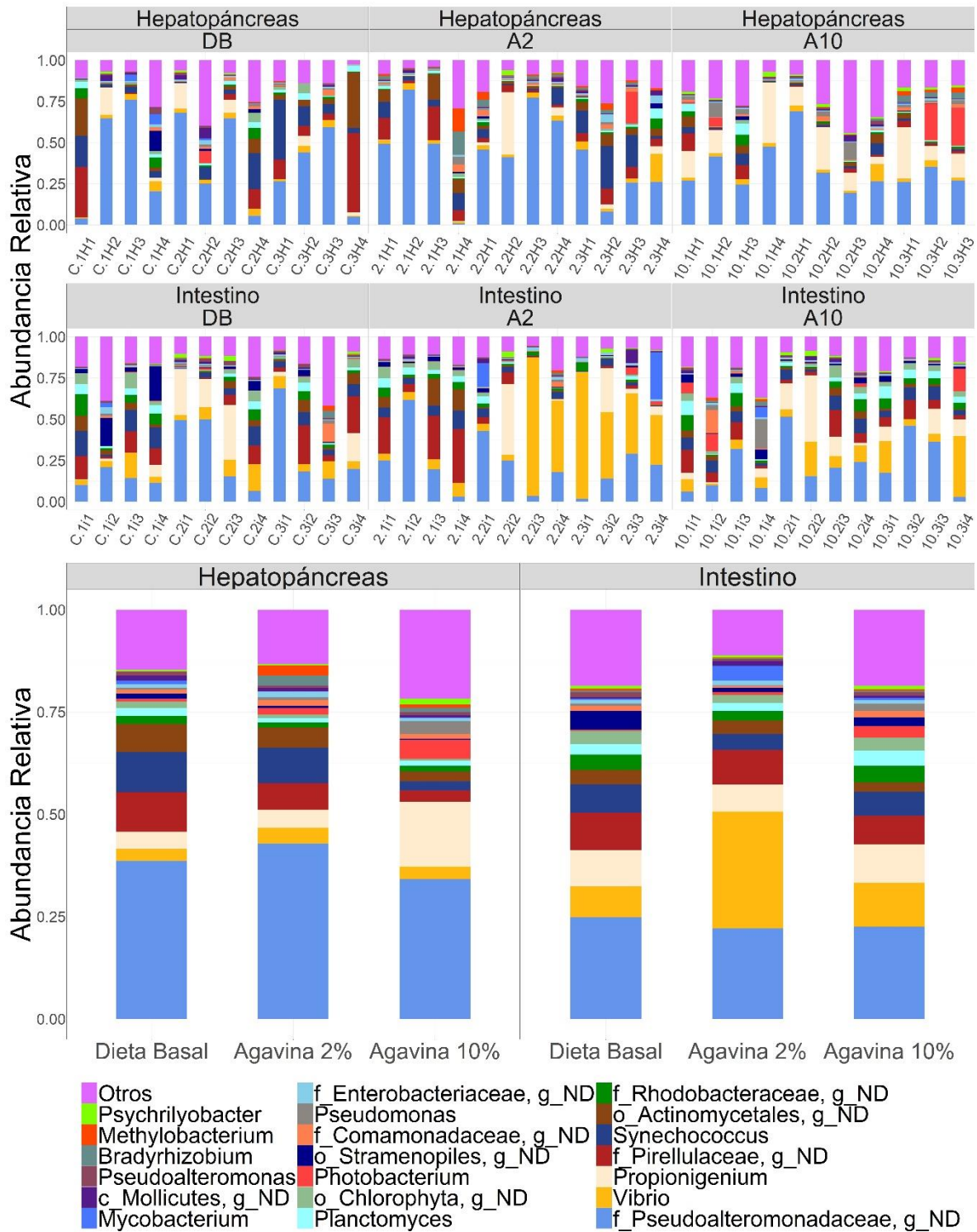


Figura 28. Abundancia relativa a nivel de género de cada una de las muestras (Arriba) y los hepatopáncreas de cada uno de los grupos (Abajo izquierda) alimentados con las distintas dietas experimentales y los intestinos de cada uno de los grupos (Abajo derecha) alimentados con las distintas dietas experimentales. Los géneros aparecen ordenadas por abundancia. Se muestra el top 20, la suma de los grupos taxonómicos restantes se muestra con la etiqueta de "Otros".

### **5.11 La agavina tiene impacto en la composición de los grupos diferenciales en los hepatopáncreas**

El análisis con *LEfSe*, para evaluar los grupos taxonómicos que son significativamente abundantes entre los distintos, tratamientos experimentales contra el control, en los hepatopáncreas, reveló un enriquecimiento de 62 grupos taxonómicos enriquecidos en los hepatopáncreas del grupo alimentado con una dieta suplementada con agavina al 2 %, mientras que para el grupo de la dieta basal no se logró apreciar ninguno. A nivel de fila, no aparecieron grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en los hepatopáncreas del grupo A2 al compararlo con el grupo DB, sin embargo, a nivel de género (Figura 29), *Lautropia*, *Ochrobactrum*, *Erwinia*, *Rubritalea*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bosea*, *Novosphingobium*, *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Anoxybacillus*, *Aquabacterium* y *Enterovibrio*, aparecieron como diferencialmente enriquecidos en el grupo A2. Se muestran aquellos grupos taxonómicos que se lograron asignar con nombre completo, aquellos *OTUs* que no se lograron asignar con nombre completo se muestran en la sección de Anexos 5.1.

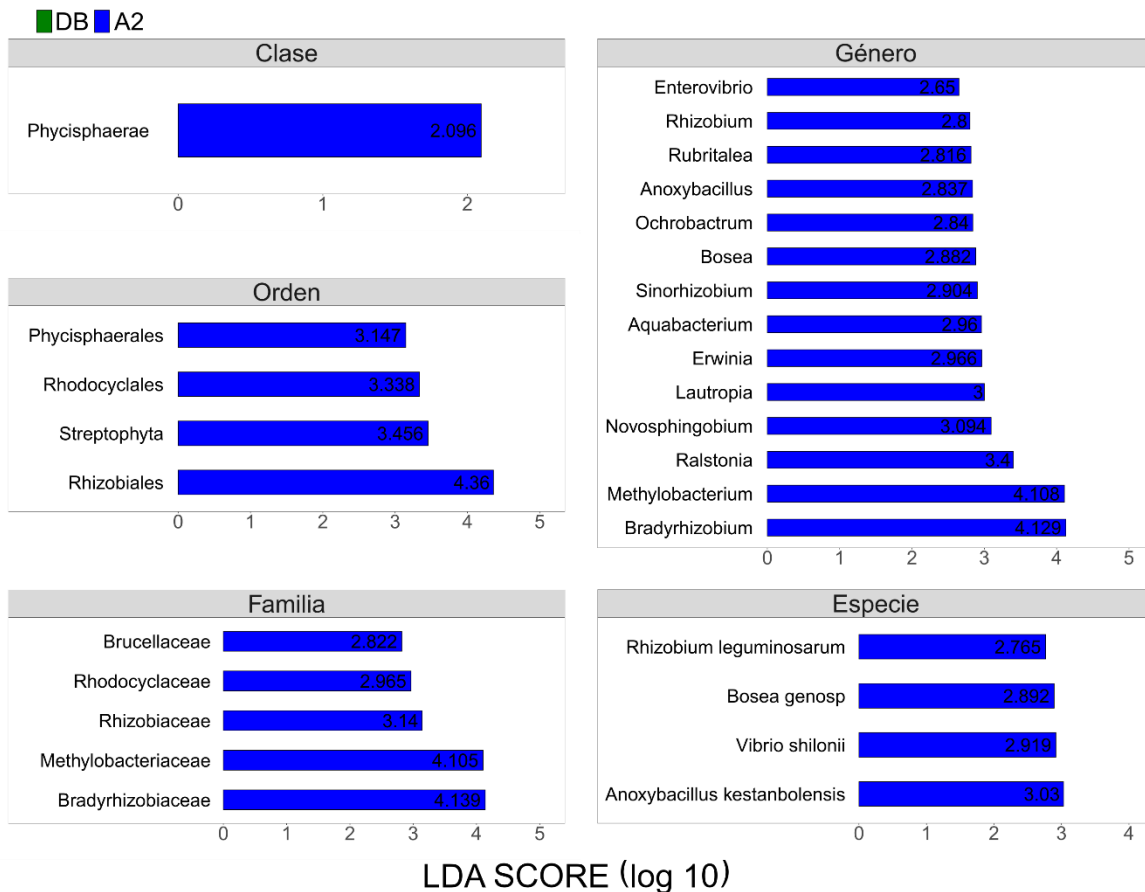
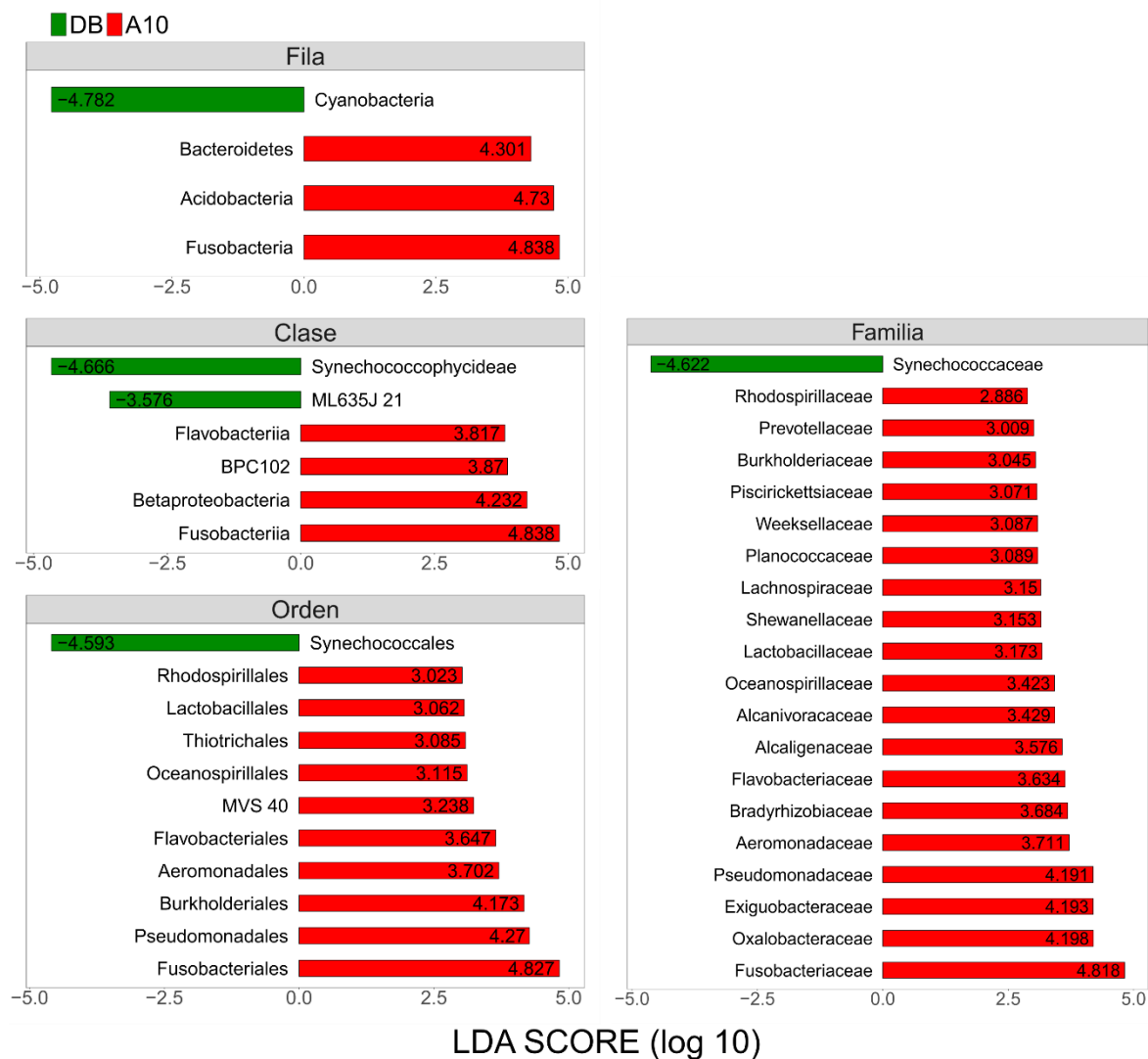


Figura 29. Grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en los hepatopáncreas de los grupos DB y A2 a nivel de clase, orden, familia, género y especie. Determinados por análisis discriminante lineal (LEfSe)

En el caso de los hepatopáncreas del grupo A10 vs DB, 123 y 15 grupos taxonómicos aparecieron significativamente enriquecidos, respectivamente. A nivel de fila, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria*, aparecieron enriquecidas en el grupo A10, mientras que, en el grupo DB, *Cyanobacteria*. Respecto al género (Figura 30) *Hydrogenophaga*, *Cloacibacterium*, *Lactobacillus*, *Rubritalea*, *Rummeliibacillus*, *Herminiimonas*, *Lautropia*, *Rhizobium*, *Enhydrobacter*, *Paracoccus*, *Psychrilyobacter*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcanivorax*, *Erwinia*, *Exiguobacterium*, *Janthinobacterium*, *Oceanospirillum*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Alteromonas*, *Bradyrhizobium*, *Novispirillum*, *Prevotella*, *Propionigenium*, *Ruminococcus*, *Shewanella* y *Stappia*, aparecieron enriquecidas

en el grupo A10, mientras que *Synechococcus* en los hepatopáncreas del grupo DB. Se muestran aquellos grupos taxonómicos que se lograron asignar con nombre completo, aquellos OTUs que no se lograron asignar con nombre completo se muestran en la sección de Anexos 5.1.



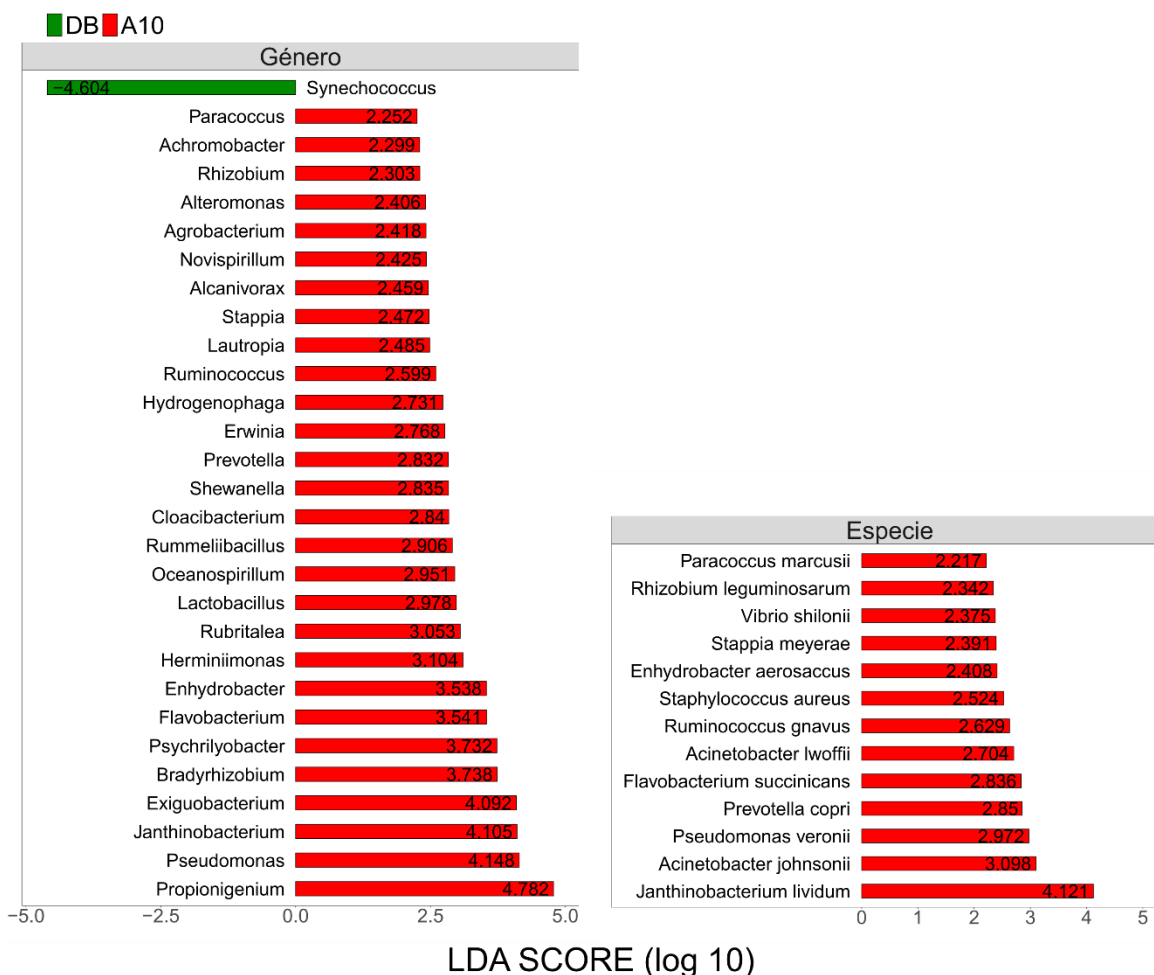
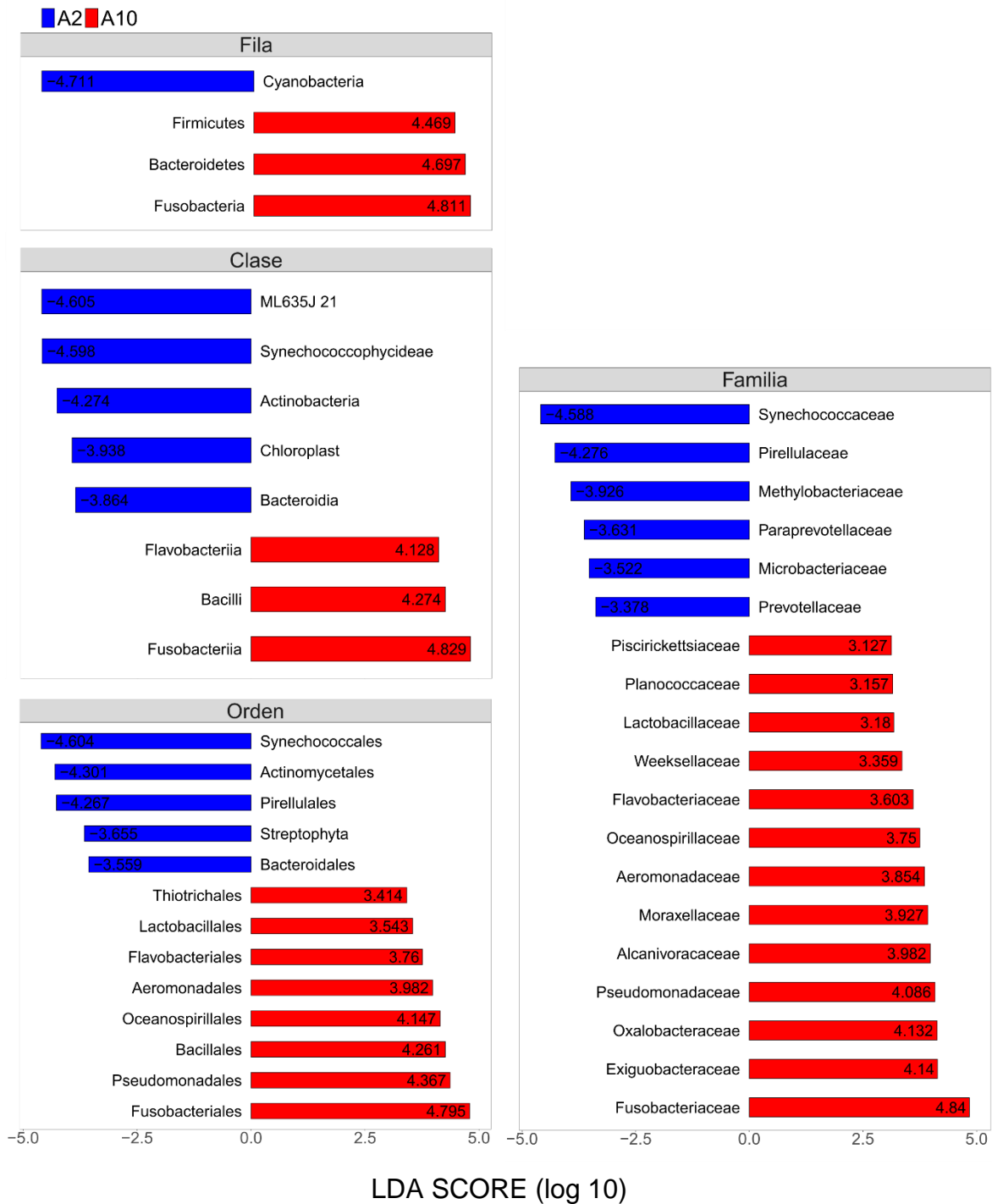


Figura 30. Grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en los hepatopáncreas de los grupos DB y A10 a nivel de fila, clase, orden, familia, género y especie. Determinados por análisis discriminante lineal (LEfSe)

Los resultados obtenidos del análisis *LEfSe*, muestran que la agavina tiene un efecto en el enriquecimiento de distintas taxas de la microbiota en los hepatopáncreas. Cabe mencionar que existieron distintos grupos taxonómicos que se vieron enriquecidos diferencialmente, independientemente de la concentración de agavina, A nivel de familia, *Bradyrhizobiaceae* y *Burkholderiaceae*. A nivel de género, *Bradyrhizobium*, *Erwinia*, *Lautropia*, *Rhizobium* y *Rubritalea*. Las especies *Rhizobium leguminosarum* y *Vibrio shilonii*. Esto podría indicar que estos grupos taxonómicos son los principales en utilizar e hidrolizar la agavina en los hepatopáncreas, mientras que los demás grupos pudiesen ser dependientes de la concentración de la agavina en el alimento, como lo revela el resultado de análisis *LEfSe* al comparar los hepatopáncreas de los grupos experimentales A2 y A10

(Figura 31). A nivel de fila, el grupo A2 mostró un mayor enriquecimiento de *Cyanobacteria*, mientras que en el grupo A10, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria* fueron las filas diferencialmente abundantes. Los géneros *Synechococcus*, *Methylobacterium*, *Prevotella*, *Paulinella*, *Prochlorococcus* y *Marivita* se encontraron diferencialmente abundantes en los hepatopáncreas del grupo A2, mientras que *Propionigenium*, *Exiguobacterium*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrilyobacter*, *Enhydrobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Stappia*, *Paenibacillus*, *Herminiimonas*, *Lactobacillus*, *Rummelibacillus*, *Hydrogenophaga*, *Cloacibacterium* y *Comamonas* en el grupo A10, este grupo además mostró un mayor enriquecimiento de grupos taxonómicos con un total de 83, mientras que en el grupo A2, el número de grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos fue de 48, esto soporta la explicación del efecto dependiente de la concentración de agavina en el alimento. Notablemente, los grupos taxonómicos que aparecen compartidos en los grupos A2 y A10 al compararlos contra el grupo DB no aparecen enriquecidos al comparar los hepatopáncreas de los grupos A2 vs A10, lo que da fuerza a la idea de que estos grupos taxonómicos no son dependientes de la concentración de agavina, si no que estos son ven enriquecidos con la presencia del prebiótico. Se muestran aquellos grupos taxonómicos que se lograron asignar con nombre completo, aquellos OTUs que no se lograron asignar con nombre completo se muestran en la sección de Anexos 5.3.



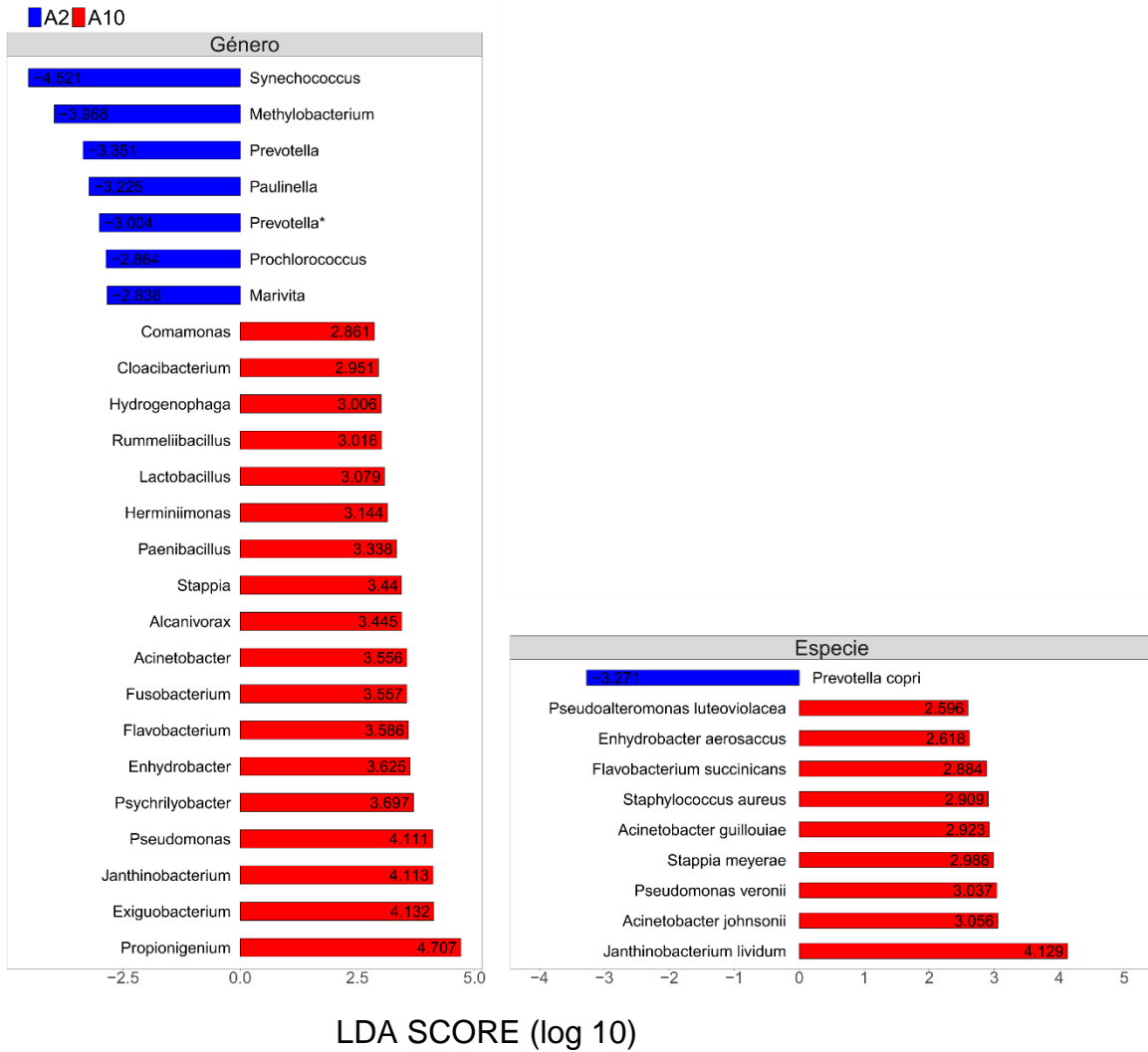


Figura 31. Grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en los hepatopáncreas de los grupos A2 y A10 a nivel de fila, clase, orden, familia, género y especie. Determinados por análisis discriminante lineal (LEfSe)



## 5.12 El impacto de la adición de agavina es menor en intestinos

Interesantemente, en los intestinos, hubo menos grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en los intestinos del grupo A2, siendo 8, contra 19 enriquecidos en el grupo alimentado con la DB. A nivel de fila, *Cyanobacteria* aparece diferencialmente enriquecido en el grupo alimentado con la dieta basal. Los géneros (Figura 32), *Citrobacter*, *Tepidimicrobium* y *Rubritalea*, aparecen enriquecidos en el grupo alimentado con agavina al 2%. *Sinorhizobium*, *Rubrivivax*, *Marivita*, *Mycoplana* y *Pseudoalteromonas* aparecen enriquecidos en el grupo alimentado con la dieta basal. Se muestran aquellos grupos taxonómicos que se lograron asignar con nombre completo, aquellos OTUs que no se lograron asignar con nombre completo se muestran en la sección de Anexos 5.2.

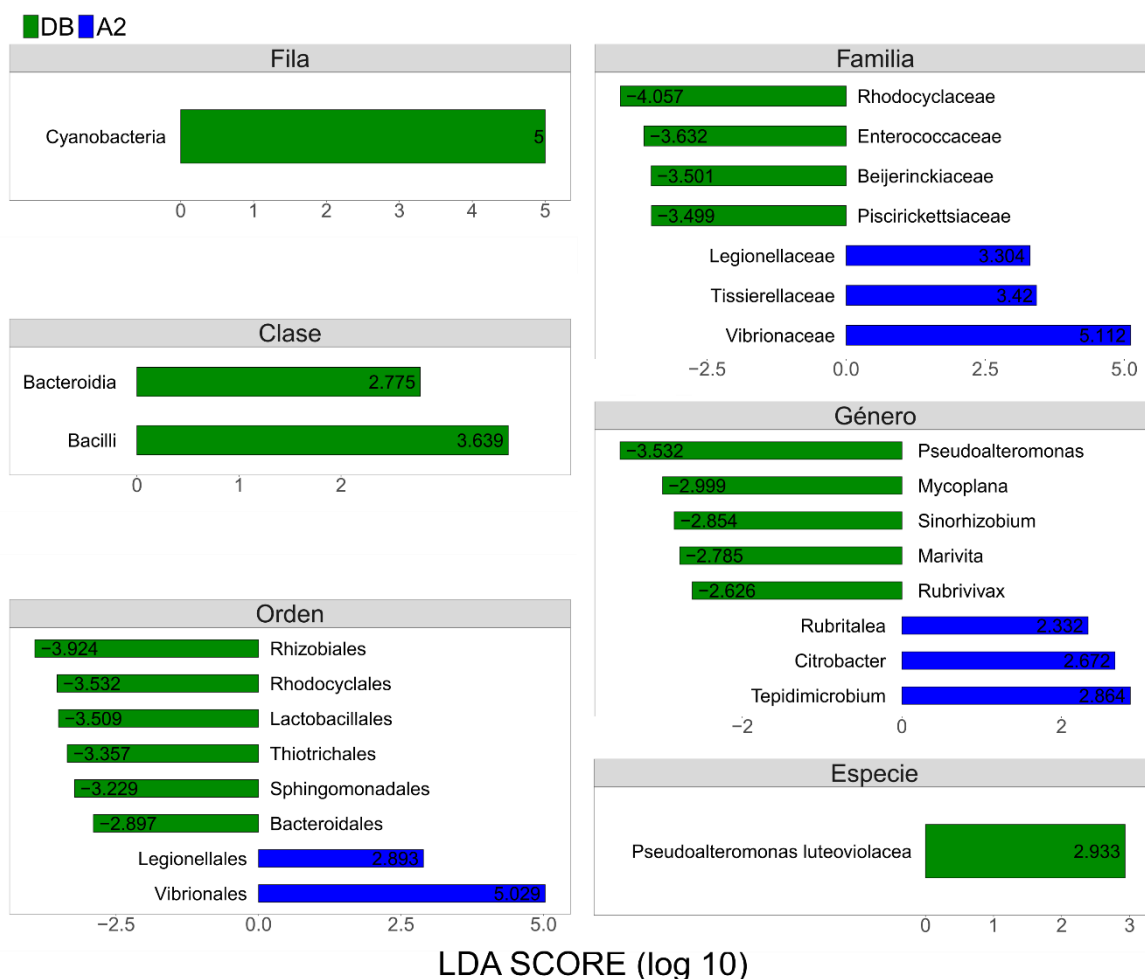


Figura 32. Grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en los intestinos de los grupos DB y A2 a nivel de fila, clase, orden, familia, género y especie. Determinados por análisis discriminante lineal (LEfSe)

Respecto al grupo A10 vs el grupo DB, el análisis LEfSe reveló que el primero cuenta con 26 grupos taxonómicos diferencialmente enriquecido vs 2 en los intestinos del grupo DB. A nivel de fila, no aparecieron grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en los intestinos del grupo A10 al compararlo con el grupo DB, sin embargo, a nivel de género (Figura 33), *Estrella*, *Stappia*, *Hydrogenophaga*, *Novispirillum*, *Rubritalea* y *Bacillus* aparecen enriquecidos en el grupo de la dieta experimental, mientras que en el grupo DB, *Rubrivivax*. Se muestran aquellos grupos taxonómicos que se lograron asignar con nombre completo, aquellos OTUs que no se lograron asignar con nombre completo se muestran en la sección de Anexos 5.2.

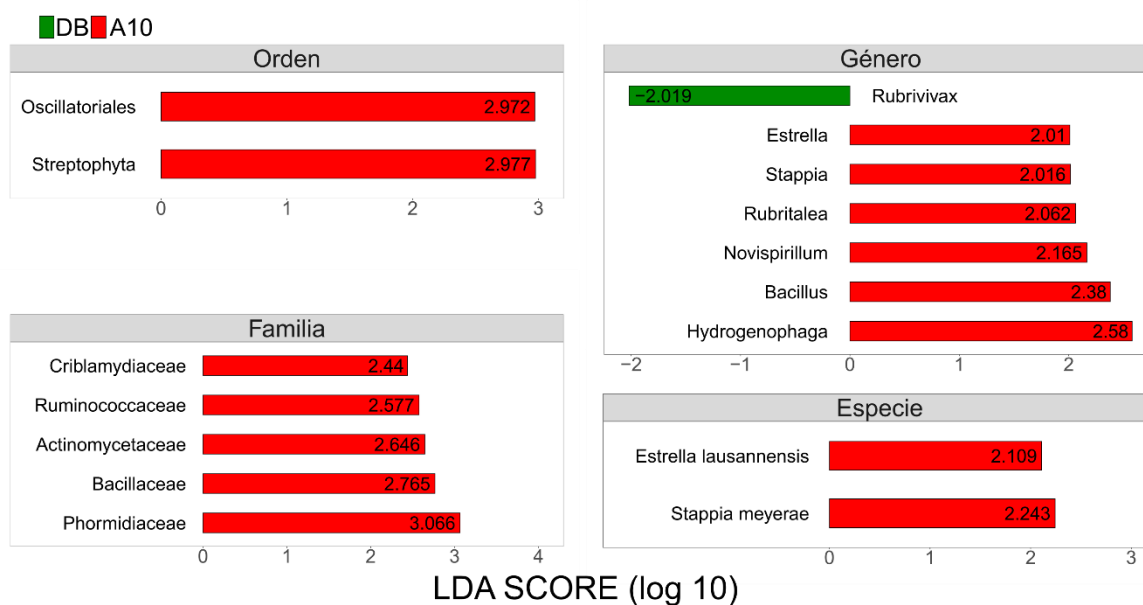


Figura 33. Grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en los intestinos de los grupos DB y A2 a nivel de orden, familia, género y especie. Determinados por análisis discriminante lineal (LEfSe)

Los resultados obtenidos sugieren que el efecto que ejerce la agavina sobre la microbiota en los intestinos es menor, dado que los grupos diferencialmente enriquecidos son menores tanto en la dieta al 2 % como en la de 10%. Cabe mencionar que en los intestinos del grupo DB aparecen más grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en comparación con el grupo A2, esto podría deberse a la pérdida de riqueza y diversidad en los intestinos de este grupo, como lo reflejan los valores obtenidos en los distintos índices de diversidad alfa. Aunado a esto, dado

que el grupo A2 obtuvo un mejor rendimiento en cuanto al aprovechamiento del alimento, posiblemente se deba a la mayor disponibilidad de nutrientes y energía para ser aprovechados por parte del hospedero. Mientras que se vio un impacto de la agavina en la diversidad alfa del grupo A2, como se comentó anteriormente, en los hepatopancreas se vio que la agavina impacta en la diversidad beta, principalmente al no ponderar por abundancia de *OTUs* (*UniFrac unweighted*) y en menor medida, aunque significativamente, al ponderar por abundancia de *OTUs* (*UniFrac unweighted*). Esto implica que en los hepatopáncreas la agavina, pareciera influenciar la presencia o ausencia de *OTUs* minoritarios y, en menor medida impacta en la abundancia de los *OTUs*, mientras que en los intestinos, el efecto pareciera ser el opuesto.

Con respecto a la comparación de los intestinos de los grupos A2 y A10, se observó que la totalidad de los grupos diferencialmente abundantes aparecen en los intestinos del grupo A10, siendo estos 139 grupos taxonómicas. Esto se podría explicar debido a que la diversidad y riqueza presentes en los intestinos del grupo A2 fue la menor, mientras que los valores más altos los obtuvo el grupo a 10. Se muestran aquellos grupos taxonómicos que se lograron asignar con nombre completo, aquellos *OTUs* que no se lograron asignar con nombre completo se muestran en la sección de Anexos 5.3.



Figura 34. Grupos taxonómicos diferencialmente enriquecidos en los intestinos de los grupos A2 y A10 a nivel de fila, clase, orden, familia, género y especie. Determinados por análisis discriminante lineal (LEfSe)

### 5.13 Análisis de la presencia de prebióticos

Como resultado de la búsqueda en la literatura de especies reportadas como probióticas, se obtuvieron 80 identificadas, y con un efecto probiótico en distintas especies de camarón (Anexo 6). Como resultado de la asignación taxonómica de los OTUs generados contra *Silva132*, se identificaron 42 especies probióticas en total.

Al analizar las especies probióticas encontradas en los hepatopáncreas de los camarones alimentados con las distintas dietas suplementadas, se puede observar un enriquecimiento de estas especies de manera dependiente de la concentración de agavina, siendo mayor para los hepatopáncreas de los camarones del grupo A10 y menor en el grupo DB, como lo revela la frecuencia relativa de las bacterias probióticas (Figura 35). Se pudo apreciar que en los hepatopáncreas de los camarones del grupo A10, la agavina pareciera promover el incremento de la frecuencia relativa de la especie *Pseudomonas putida*, mientras que para el grupo A2, se observó un incremento en la frecuencia relativa de la especie *Vibrio hepatarius*.

Al comparar los hepatopáncreas de los grupos experimentales contra el grupo alimentado con la dieta basal por separado, se puede observar que la dieta suplementada con agavina al 10 %, favorece un enriquecimiento diferencial de las bacterias probióticas, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus pentosus* y *Pseudomonas synxantha*. Respecto a los hepatopáncreas del grupo A2, *Rhodopseudomonas palustris* y *Streptococcus thermophilus* aparecen significativamente enriquecidas con respecto al tratamiento control (Figura 36).

En el caso de los intestinos, se pudo apreciar que hay un mayor enriquecimiento de especies probióticas, de acuerdo con la frecuencia relativa, en los intestinos del grupo A2. Este incremento, en el enriquecimiento de los intestinos del grupo A2, con respecto a los intestinos de los grupos DB y A10, pareciera ser explicado por el aumento en la abundancia de la especie *Vibrio hepatarius* (Figura 37). Esta abundancia de la especie *Vibrio hepatarius* en los intestinos del grupo A2 correlaciona con el enriquecimiento diferencial del orden *Vibrionales*, como lo revela

el análisis *LEfSe* y la mayor abundancia del género *Vibrio*, como lo revela el análisis de la taxonomía, mientras que a la par, se observó el descenso de las especies minoritarias (< 20). Esto podría explicar que la riqueza y diversidad en los intestinos de los camarones del grupo A2, haya sido diferencialmente menor con respecto al grupo DB. Esto podría implicar la estrecha relación comensal entre algunas especies del género *Vibrio*, y el intestino de *L. vannamei*. Lo anterior, junto al mejor crecimiento de los camarones alimentados con la dieta suplementada con agavina al 2 %, en comparación con el grupo alimentado con la dieta basal, implicaría que posiblemente, de entre las especies pertenecientes al género *Vibrio* pudiesen existir otras cuyo efecto sea positivo para el crecimiento de *L. vannamei* y/o protector antagonistas de otras especies patógenas, por lo que este género, asociado comúnmente a patógenos en animales marinos, podría estar también asociado a especies con efectos probióticos.

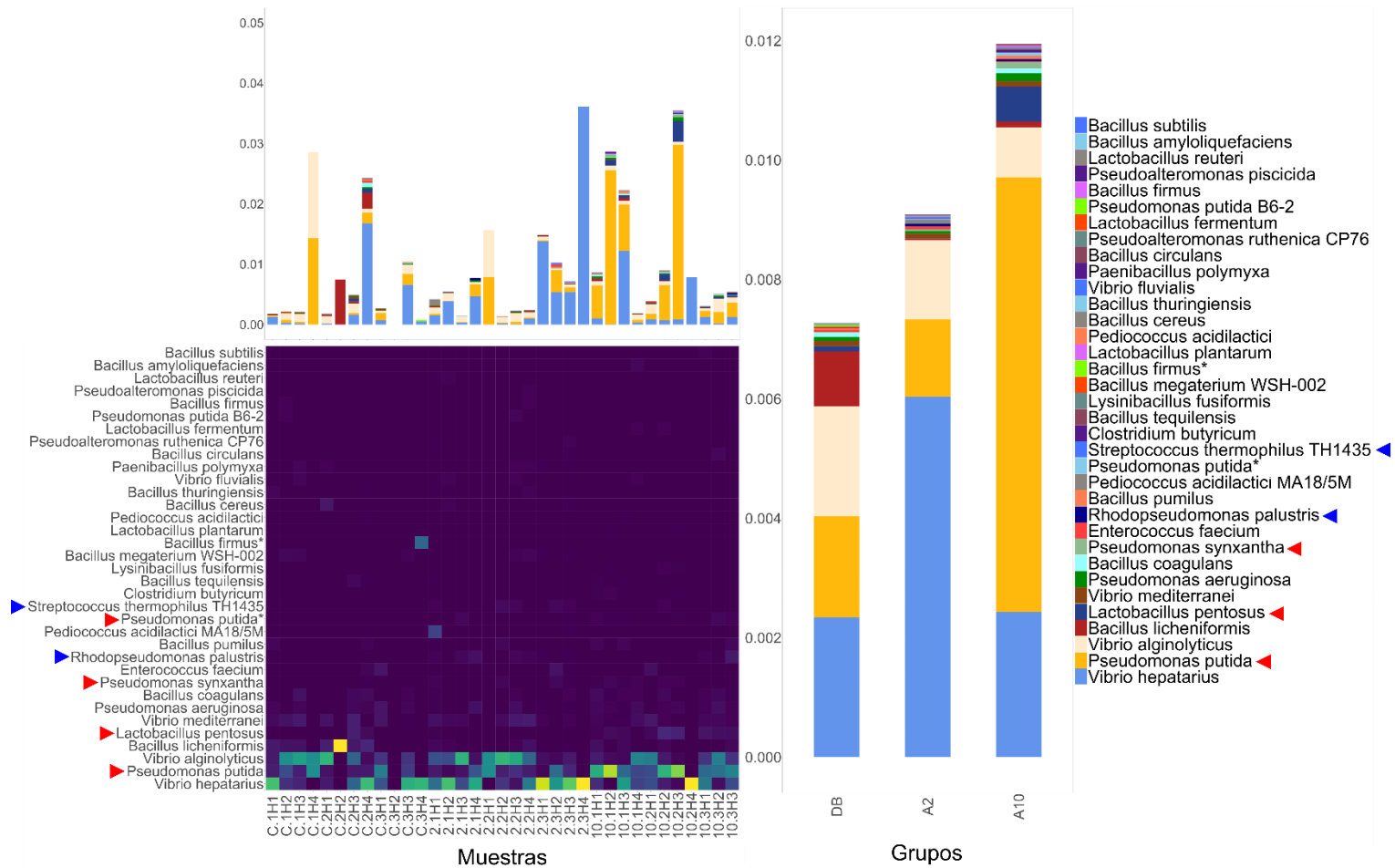


Figura 35. Distribución de las especies probióticas detectadas en los hepatopáncreas de los distintos tratamientos. Arriba a la izquierda) Las barras representan la frecuencia relativa acumulada de cada una de las especies probióticas para cada muestra. Abajo a la izquierda) El heatmap representa la distribución de la frecuencia relativa de las especies para cada muestra. Derecha) Las barras representan el promedio del acumulado de la frecuencia relativa de las especies probióticas en cada muestra agrupadas por tratamiento. La marca "\*" indica que esta especie se encuentra asignada bajo una taxonomía superior diferente a la misma especie pero que no tiene la marca. Las flechas azules señalan especies diferencialmente abundantes en los hepatopáncreas del grupo A2 con respecto al grupo DB. Las flechas rojas señalan especies diferencialmente abundantes en los hepatopáncreas del grupo A10 con respecto al grupo DB.

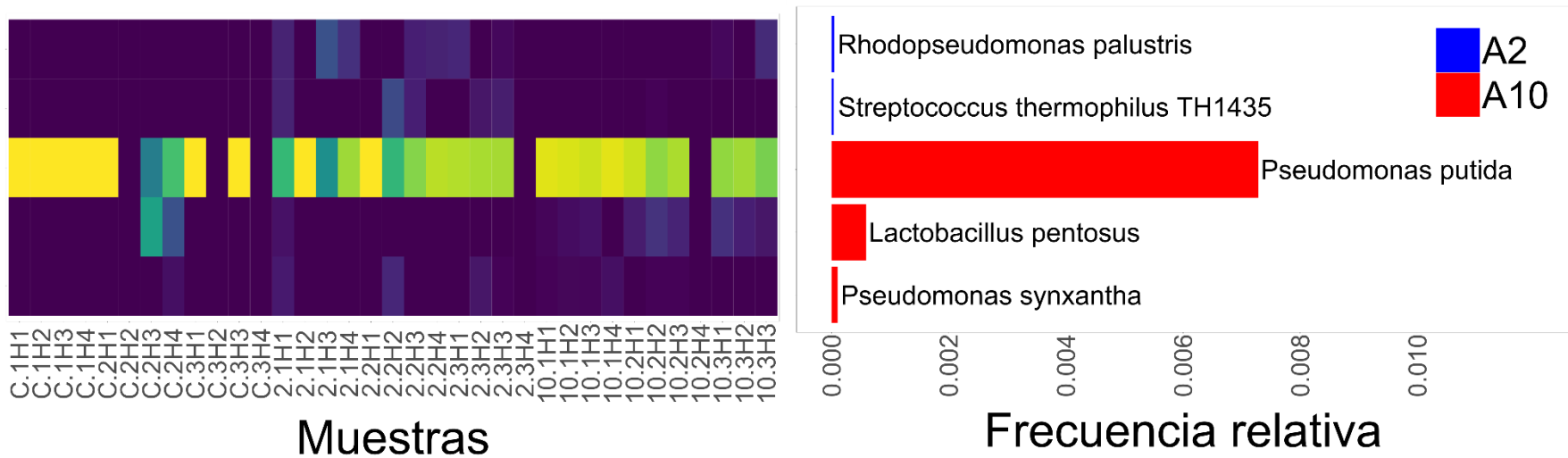


Figura 36. Distribución de las especies probióticas diferencialmente abundantes en los hepatopáncreas de cada tratamiento experimental contra el tratamiento control. Izquierda) El heatmap representa la distribución de la frecuencia relativa de las especies probióticas diferencialmente abundantes en los hepatopáncreas de cada tratamiento. Derecha) Las barras representan la frecuencia relativa de la especie diferencialmente abundante vs el tratamiento control, el color de la barra representa el tratamiento experimental.



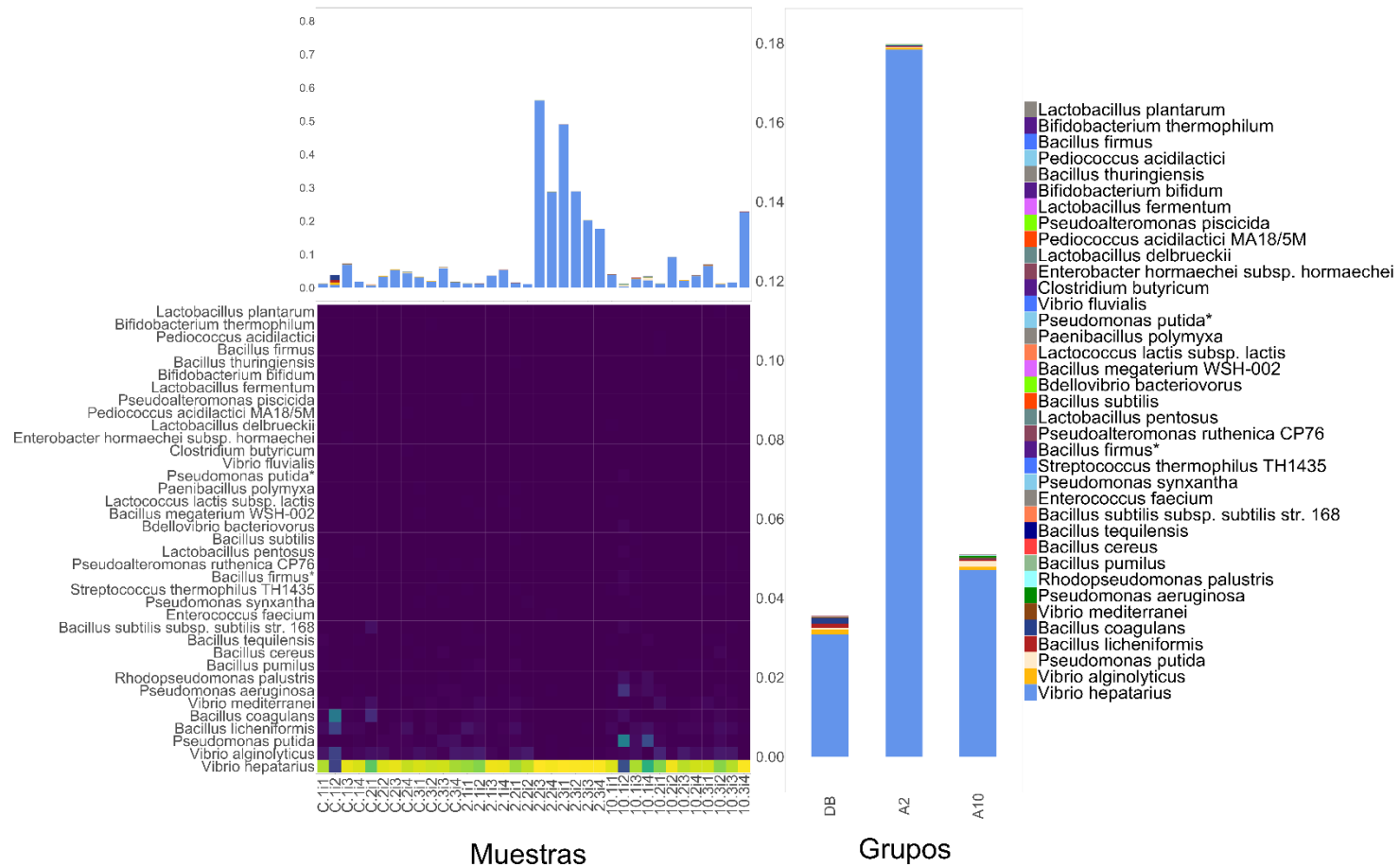


Figura 37. Distribución de las especies probióticas detectadas en los hepatopáncreas de los distintos tratamientos. Arriba a la izquierda) Las barras representan la frecuencia relativa acumulada de cada una de las especies probióticas para cada muestra. Abajo a la izquierda) El heatmap representa la distribución de la frecuencia relativa de las especies para cada muestra. Derecha) Las barras representan el promedio del acumulado de la frecuencia relativa de las especies probióticas en cada muestra agrupadas por tratamiento. La marca "\*" indica que esta especie se encuentra asignada bajo una taxonomía superior diferente a la misma especie pero que no tiene la marca.

## 6. Discusión y conclusiones

### 6.1 La agavina como promotor de crecimiento en *L.vannamei*

Dada la creciente demanda, y los retos que enfrenta el cultivo de *L. vannamei*, es de especial interés desarrollar estrategias que permitan hacer frente a estos desafíos. Entender el papel que juega la microbiota en el desarrollo de este organismo, es fundamental para conocer su impacto en el fenotipo del camarón.

Múltiples estudios han demostrado el efecto positivo del uso de prebióticos, como aditivos alimenticios promotores del crecimiento, en el cultivo de camarón (Zhou & Huiyuan, 2007; Pourmozaffar *et al*, 2017; Supungul *et al*, 2017, Duan *et al*, 2019; Li *et al*, 2019; Zhou *et al*, 2020). En este estudio se evaluó el uso de dietas suplementadas con distintas concentraciones de agavina como prebiótico. Interesantemente la adición de agavina mostró un efecto favorable sobre el crecimiento del grupo que contenía agavina al 2 % (A2), como lo revela el valor FCA obtenido por este grupo y que concuerda con los resultados obtenidos por otros estudios al utilizar fuentes distintas de fibras dietéticas como prebióticos (Zhou & Huiyuan, 2007; Hu *et al*, 2019; Gainza & Romero 2020; Zhou *et al*, 2020). Tal efecto positivo sobre el factor de conversión alimenticia de *L. vannamei* podría deberse a que la agavina estimula la secreción de enzimas digestivas (amilasas, proteasas, lipasas, etc.) y, por lo tanto, el camarón puede aprovechar de manera más eficiente los nutrientes en la dieta. Tal como fue reportado por Duan *et al* (2019), encontraron que dietas isocalóricas, suplementadas con amilosa de maíz resistente a la digestión, promueven una mayor actividad de enzimas como amilasa, lipasa, tripsina y pepsina. Adicionalmente, encontraron que la actividad de enzimas relacionadas con la actividad inmune del camarón como, profenoloxidasa, factores anti-lipopolisacáridos y lisozima, se ve promovida por la adición de la amilosa de maíz resistente a la digestión, lo que podría implicar un efecto favorable sobre la salud del camarón. Resultados similares se han encontrado al utilizar otros polisacáridos como prebióticos. Li *et al* (2019), reportaron que dietas suplementadas únicamente con  $\beta$ -glucanos, promueven el crecimiento de *L. vannamei* y aumenta el contenido proteico en la carne del camarón, lo que concuerda con los resultados

obtenidos en este estudio, y que se ven reflejados en el aprovechamiento de la proteína suministrada en la dieta, como lo revela el valor TEP.

Los fructooligosacáridos han demostrado también tener un efecto benéfico en el aprovechamiento de nutrientes, lo que se ha visto reflejado en una mayor ganancia de peso (Zhou & Huiyuan, 2007; Hu *et al*, 2019). La agavina, conocida también como fructanos del agave, son mezclas complejas que se encuentran en distintas especies de agave, por tanto, funcionan como fibra dietética resistente a la digestión. Peña-Rodríguez *et al* (2020), evaluaron alimentos suplementados con distintas concentraciones de extracto crudo de *A. lechuguilla* en el crecimiento de *L. vannamei*, encontrando que a una concentración de 0.3 %, el valor obtenido del factor de conversión alimenticia fue significativamente menor en comparación con el grupo control; mientras que el peso ganado, y la tasa específica de crecimiento fueron significativamente mayores en el grupo tratado con el extracto al compararlo contra el grupo control. Adicionalmente, encontraron que el alimento suplementado con el extracto tuvo un efecto positivo sobre la altura de las células epiteliales en los túbulos de los hepatopáncreas de los camarones de dicho grupo. El valor obtenido del factor de conversión alimenticia concuerda con el obtenido en este trabajo, específicamente por el grupo A2, aunque no por el grupo A10. Aunado a lo anterior, la adición de agavina también ha demostrado promover una mayor actividad de enzimas implicadas en el sistema inmune, y una mayor protección contra infecciones como la causada por WSSV (Luna-González *et al*, 2012; Partida-Arangure *et al*, 2013; Gutiérrez-Dagnino).

## **6.2 El impacto de la agavina sobre la microbiota en hepatopáncreas e intestino de *L. vannamei***

La adición de agavina mostró disminuir tanto la diversidad como la riqueza en los intestinos de los camarones del grupo A2, cabe mencionar que este efecto no se ve reflejado en los hepatopáncreas, en los cuales, el impacto de la agavina tiene una mayor influencia sobre la presencia de *OTUs* minoritarios (Figura 38). Tal reducción observada en los intestinos, concuerda con lo reportado por otros

estudios que han evaluado el impacto de otros prebióticos en el intestino del camarón (Duan *et al*, 2017; Zhou *et al*, 2020). Tal pérdida de diversidad y riqueza, podría estar íntimamente relacionada con un mayor crecimiento de *L. vannamei*, lo que podría sugerir una mayor disponibilidad de energía para el hospedero (Fan *et al*, 2019).

A pesar de que en el grupo A10, no se observó diferencia significativa, se pudo apreciar que la adición de agavina tiende a incrementar la riqueza y diversidad de la microbiota en los intestinos de este grupo con respecto al grupo DB, sin embargo, también se observó que fue el grupo que presentó el peor rendimiento.

Se ha descrito en *L. vannamei* y en pez cebra que los procesos estocásticos, generalmente relacionados con el ambiente, que modulan la microbiota en el intestino pierden fuerza, mientras que procesos determinísticos, como la presión selectiva ejercida por el sistema inmune, son más relevantes a medida que el hospedero madura, y la capacidad del sistema inmune para regular las poblaciones bacterianas que proliferan en sus intestinos (Xiong *et al*, 2017, Burns *et al*, 2016), dado que los intestinos del grupo A2, presentaron una menor diversidad y riqueza, este efecto puede deberse a que hay una mayor actividad de moléculas implicadas en el sistema inmune, lo cual supondría una mayor capacidad por parte del hospedero para ejercer una presión selectiva sobre las bacterias que proliferan en los intestinos de este grupo, lo cual podría explicar que los valores de riqueza y diversidad que se observaron en los intestinos del grupo A2 fuesen los más bajos, y su rendimiento haya sido el mejor. Este efecto no se logró apreciar en los intestinos de los camarones del grupo A10, dejando claro el efecto dependiente de la concentración (Figura 38). Resultados similares se han podido observar con la adición de fibra dietética resistente a la digestión, la cual provoca una disminución significativa de la diversidad y riqueza a una concentración del 3 %, con respecto al grupo control, mientras que hay un aumento de la diversidad y riqueza a concentraciones del 1 y del 5 %, con respecto al grupo control (Duan *et al*, 2019).

Generalmente se suele asociar una mayor diversidad de la microbiota con un enterotipo más saludable para el hospedero en comparación con una menor

diversidad, debido a que un ecosistema con mayor diversidad es capaz de proveer una mayor estabilidad, resistencia y resiliencia al estrés ambiental, debido a la redundancia funcional (Naeem & Li, 1997, Le Chatelier *et al*, 2013; Fan *et al*, 2019). Sin embargo, en lo que respecta al intestino, pareciera que una diversidad mayor no necesariamente implicaría un enterotipo saludable. Un ejemplo de esto lo reportan (Cornejo-Granados *et al*, 2017), que encontraron que los intestinos de camarones cultivados saludables presentaron una menor diversidad y riqueza de OTUs en comparación con camarones enfermos con AHPND/EMS.

Hoffmnan *et al* (2019), reportó que ratones alimentados con inulina presentaban una menor riqueza y diversidad que los ratones del grupo control, el cual no se alimentó con inulina. Sin embargo, los ratones alimentados con inulina incrementaron la abundancia relativa de grupos taxonómicos putativamente benéficos como el género *Prevotella*, mientras que se redujo la frecuencia relativa de géneros potencialmente proinflamatorios, como *Escherichia* y *Turicibacter*. Un incremento en la diversidad y riqueza de la microbiota se ha asociado con estados patológicos como el desarrollo de alzhéimer y complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad o el envejecimiento en ratones (Hoffmnan *et al*, 2017). Oligosacáridos de origen bovino han demostrado incrementar la abundancia de bacterias probióticas del género *Bifidobacterium*, mientras que reducen la diversidad y riqueza de la microbiota en infantes (Simeoni *et al*, 2016). El uso de prebióticos ha mostrado tener un impacto profundo sobre la diversidad y la riqueza de la microbiota de *L. vannamei*, Hasyimi *et al* (2020), ha reportado que el uso de miel de abeja como prebiótico causa un aumento de la diversidad y riqueza en los intestinos de *L. vannamei*, e impactó de manera favorable en su crecimiento. Estos resultados contrastan con los resultados reportados por Zhou *et al* (2020), quien observó que la inulina causa un descenso de la riqueza y diversidad de la microbiota, un efecto observado en el presente estudio en los intestinos del grupo alimentado con una dieta suplementada con agavina al 2 %. Tal efecto en la disminución de la riqueza y diversidad pudiese estar causado por la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales han demostrado tener un efecto similar sobre la diversidad alfa de *L. vannamei* (Duan *et al*, 2017).

Los análisis de diversidad beta revelaron que la adición de agavina ejerce un mayor efecto en la estructura de la microbiota del hepatopáncreas, tanto en el grupo A2, como en el A10, mientras que este efecto no se ve reflejado en los intestinos. Estos resultados indican que el efecto que ejerce la agavina, sobre la microbiota del hepatopáncreas, es regulando la presencia o ausencia de *OTUs* minoritarios, y en menor medida, sobre la abundancia, como lo revelan los valores R del análisis de *ANOSIM*. Dado que el principal efecto de la agavina es sobre la presencia o ausencia de *OTUs* minoritarios, podría implicar que la microbiota en el hepatopáncreas es menos propensa a ser modificada en la abundancia de los grupos taxonómicos mayoritarios, al menos con la adición de agavina, independientemente de la concentración, como lo indican los valores obtenidos en la diversidad alfa, ya que no hubo diferencia significativa entre los grupos. Esto se podría explicar debido a que se ha reportado que el impacto de la dieta sobre la microbiota, es inferior al impacto que ejercen los factores ambientales, como la salinidad del agua, o el efecto órgano-dependiente (Cornejo-Granados *et al*, 2018). Aunado a esto, algunos estudios han revelado que la microbiota del hepatopáncreas podría mostrar esta tendencia hacia una mayor estabilidad debido a que juega un papel clave en la asimilación de energía y nutrientes (Tzuc *et al*, 2014; Cheung *et al*, 2015).

En *L. vannamei*, tanto el estómago pilórico como el cardiaco, se encuentran conectados al hepatopáncreas mediante conductos capaces de filtrar el alimento por tamaño de partícula (Vogt, 2019; Pattarayingsakul *et al*, 2019), este parámetro es clave a la hora de implementar cualquier estrategia que implique la adición de suplementos en el alimento que tenga como finalidad la modulación de la microbiota hacia un enterotipo que promueva el crecimiento de *L. vannamei*. La suplementación con agavina al 2 % ha mostrado ser un aditivo prometedor capaz de promover el cultivo de *L. vannamei*, mejorando su rendimiento, aunque no necesariamente el enriquecimiento de bacterias prebióticas reportadas, sin embargo, hace falta indagar más sobre su efecto en el nivel de expresión de moléculas involucradas en el sistema inmune, tanto para conocer su potencial como protector contra las distintas infecciones que amenazan la producción de este camarón, así como su efectividad en distintas líneas genéticas de *L. vannamei*.

El análisis de la taxonomía reveló que el género más abundante, en los hepatopáncreas, independientemente de la dieta experimental, fue un género no determinado de la familia de *Pseudoalteromonadaceae*, aunque también se vio enriquecido el género *Propionigenium* en los hepatopáncreas del grupo A10 el cual se ha reportado como generador de ácidos grasos de cadena corta, el principal metabolito obtenido de la fermentación de la fibra dietética. (Graue *et al*, 2012; den Besten *et al*, 2013; Tuncil *et al* 2018).

En el intestino, el género más abundante fue uno no determinado perteneciente a la familia de *Pseudoalteromonadaceae*, para el grupo DB y A10. *Vibrio* fue el género más abundante en los intestinos del grupo A2. A pesar de que a este género pertenecen varias especies patógenas para camarón (Goarant *et al*, 2000; Defoirdt *et al*, 2006; Rattanama *et al*, 2012), también se han reportado algunas especies comensales, e incluso benéficas pertenecientes al género *Vibrio* (Gullian *et al*, 2004; Carraturo *et al*, 2006; El-Sersy *et al*, 2006; Thompson *et al*, 2010) y que se han reportado en los intestinos de los camarones saludables (Cornejo-Granados *et al*, 2017). Hace falta comentar que también se pudo apreciar una disminución en la frecuencia relativa en los OTUs minoritarios en el grupo A2, lo cual explica sus valores más bajos en los resultados obtenidos en los análisis de riqueza y diversidad. Esta pérdida de diversidad pareciera explicar el aumento de la frecuencia relativa del género *Vibrio*, en los intestinos del grupo A2, lo que podría indicar una adaptación evolutiva a los intestinos de *L. vannamei*.

Interesantemente, con el análisis de abundancia diferencial, se pudo apreciar que algunos grupos taxonómicos se ven enriquecidos tanto en los hepatopáncreas del grupo A2, como A10 con respecto al grupo DB. Lo que implicaría que estos grupos taxonómicos no son dependientes de la concentración de agavina. A nivel de clase, estos fueron *Verrucomicrobiae*. A nivel de familia, *Bradyrhizobiaceae* y *Burkholderiaceae*. A nivel de género, *Bradyrhizobium*, *Erwinia*, *Lautropia*, *Rhizobium* y *Rubritalea*. Las especies *Rhizobium leguminosarum* y *Vibrio shilonii*

El género *Rhizobium* y *Erwinia* se han reportado como propios de plantas, en el caso de *Rizobium*, es un género que se internaliza en las raíces de algunas

plantas y está implicada en la fijación de nitrógeno y la síntesis de polihidroxibutirato (PHB), un ácido graso de cadena corta (Resendis-Antonio *et al*, 2007). *Erwinia*, por su parte, está asociado a la degradación de fibras dietéticas y pectina. Varias especies pertenecientes a este género se consideran patógenas para algunas plantas, precisamente por su capacidad para degradar componentes vegetales (Morovan *et al*, 1988, Konecki *et al*, 2013). Aunado a esto se ha reportado que se encuentra preferentemente en intestinos cuando la dieta es alta en sal (Bier *et al*, 2018), lo que podría explicar que esté presente en ambientes de agua salada y en presencia de agavina. *Lautropia* es un género capaz de fermentar tanto glucosa como fructosa y se ha visto asociado a la producción e ácidos grasos de cadena corta. (Gerner-Smidt *et al*, 1994; Zhu *et al*, 2020). *Rubritalea* es un género que cuenta con varias especies propias de ambientes marinos (Scheuermayer *et al*, 2006; Kasai *et al*, 2007; Song *et al*, 2018), Cabe mencionar que se ha reportado que la administración de las algas, *Ulva lectuca*, *Undaria pinnatifida* y *Gracilaria lemaneiformis*, incrementan la frecuencia relativa de este género, así como la expresión de genes involucrados en la inmunidad de en *L. vannamei* (Niu *et al*, 2019; Elizondo-González, *et al*, 2020). El género *Bradyrhizobium* se ha encontrado diferencialmente abundante en los intestinos de salmones que se encontraban en agua marina y que fueron alimentados con el probiótico *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, en comparación a peces a los cuales no se les administró el probiótico o aquellos que fueron mantenidos en agua dulce, a pesar de haber recibido el probiótico. Se reportó además un efecto de protección en los salmones al ser retados con IPNV (Del inglés: *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*) (Jaramillo-Torres *et al*, 2019). Tanto el género *Pediococcus* como *Bradyrhizobium* están implicadas en el metabolismo de ácidos grasos de cadena corta, el primero con la formación de ácido láctico, mientras que el segundo con la formación de ácido acético, a partir de la fermentación de carbohidratos solubles de maíz (Guan *et al*, 2018).

Los géneros *Enterovibrio*, *Anoxybacillus*, *Ochrobactrum*, *Bosea*, *Sinorhizobium*, *Aquabacterium*, *Novosphingobium*, *Ralstonia* y *Methylobacterium* corresponden a aquellos enriquecidos exclusivamente en los hepatopáncreas del



grupo A2 con respecto al grupo DB, mientras que *Paracoccus*, *Achromobacter*, *Alteromonas*, *Agrobacterium*, *Novispirillum*, *Alcanivorax*, *Stappia Ruminococcus*, *Hydrogenophaga Prevotella*, *Shewanella*, *Cloacibacterium*, *Rummeliibacillus*, *Herminiimonas*, *Enhydrobacter*, *Flavobacterium*, *Psychrilyobacter*, *Exiguobacterium*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* y *Propionigenium* fueron aquellas enriquecidas exclusivamente en los hepatopáncreas del grupo A10 con respecto al grupo DB. Esto revela que en el hepatopáncreas hay géneros que se enriquecen de manera dependiente de la concentración de agavina.

Del análisis de las especies probióticas se puede apreciar que es principalmente en el hepatopáncreas en donde se da el mayor enriquecimiento de especies probióticas, especialmente en los hepatopáncreas del grupo A10. Esto podría llevar a considerar que un alimento suplementado con agavina al 10 %, ofrece una mejor protección contra posibles patógenos, aun así, este grupo es el que mostró un peor rendimiento (Figura 38), como lo revela el valor de FCA, esto debido a que la fibra en exceso es se ha llegado a considerar como antinutriente, que puede llegar a impedir una óptima absorción de nutrientes, además de estar asociada a trastornos gastrointestinales (Coudray *et al*, 2013; Greger, 1999).

Estos hallazgos dejan claro que la concentración de prebiótico es un parámetro clave a tomar en cuenta a la hora de implementar una estrategia basada en la adición de prebióticos al alimento, en el cultivo de *L. vannamei* (Figura 38).

Diversos estudios han encontrado un efecto similar en distintas especies, en las cuales una concentración menor de fibra dietética resistente a la digestión, ejerce un efecto más favorable en comparación a una mayor concentración. E incluso se ha encontrado que altas dosis de prebiótico implican un efecto negativo sobre el hospedero (Roberfroid *et al*, 1998; Rao, 1999; Bouhnik *et al*, 2007; Kolida *et al*, 2007; Calame *et al*, 2008; Costabile *et al*, 2016; Zhou *et al*, 2017; García-Curbelo *et al*, 2018; Singh *et al*, 2018).

En cerdos se ha observado que dietas suplementadas con agavina al 0.25 % impactan en el metabolismo lipídico al reducir de manera significativa el colesterol total, LDL y lípidos totales con respecto al grupo que no se le suministró agavina. E

incluso se observó que la reducción de lípidos totales fue significativamente mayor al compararlo contra el grupo al que se le suministró alimento enriquecido con 0.50 % de agavina (García-Curbelo *et al*, 2018). Adicionalmente se ha reportado que una concentración elevada de fibra resistente a la digestión, a pesar de tener un potencial efecto positivo sobre el epitelio intestinal en cerdos, la asimilación de la proteína dietética se ve afectada (Zhou *et al*, 2017). En ratones se ha observado que una concentración de 25 % de inulina puede causar aversión hacia el alimento, y consecuentemente una disminución de masa corporal, tanto masa magra como adiposa (Singh *et al*, 2018). En humanos se ha encontrado que el efecto benéfico de prebióticos como la goma arábica o fibra de maíz, alcanzan un límite de eficacia a 10 y 6 g día<sup>-1</sup> de alimento respectivamente. A mayores concentraciones no se observó un efecto significativo en el enriquecimiento de bacterias del género *Bifidobacterium* (Calame *et al*, 2008; Costabile *et al*, 2016) La inulina ha mostrado tener propiedades bifidogénicas en humanos, tal efecto se ha logrado apreciar aún a bajas concentraciones del prebiótico. Interesantemente algunos estudios han determinado que una ingesta elevada no necesariamente está implicada en un efecto bifidogénico mayor, si no que la abundancia de *bifidobacterium* en cada individuo podría ser determinante en la eficiencia de la inulina para promover el crecimiento de *bifidobacterium*, de modo que a una menor abundancia de este tipo de bacterias, el prebiótico mostraría un mayor efecto al promover la abundancia de las *bifidobacterium*, mientras que en el caso de individuos con una abundancia mayor, la inulina pareciera no enriquecer en la misma medida a estas bacterias. Esto implicaría que en la microbiota intestinal, de individuos saludables, existe una resiliencia que no permite ser ampliamente alterada, independientemente de la cantidad de inulina suministrada, que en dosis de hasta 5 g día<sup>-1</sup>, ha mostrado que es capaz de generar malestar intestinal, como gases o inflamación (Roberfroid *et al*, 1998; Rao, 1999; Bouhnik *et al*, 2007; Kolida *et al*, 2007).

El uso de agavina como aditivo alimenticio capaz de promover un fenotipo favorable en ratones, y el enriquecimiento de géneros probióticos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se ha estudiado ampliamente en ratón (Santiago-García & López, 2014; García-Curbelo *et al*, 2015; Huazano-García & López, 2015;

Huazano-García *et al*, 2017; González-Herrera *et al*, 2019 & 2019b). La producción de ácidos grasos de cadena corta, es uno de los principales metabolitos producidos por la microbiota intestinal mediante la fermentación de la agavina (Huazano-García & López, 2015; González-Herrera *et al*, 2019 & 2019b) y al ser ácidos carboxílicos, son capaces de reducir el pH del lumen intestinal en ratones, promoviendo potencialmente el enriquecimiento o mantenimiento de bacterias involucradas en la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales, han mostrado ser capaces de revertir desordenes metabólicos generados por una dieta alta en grasa en ratones (Santiago-García & López, 2014; Huazano-García & López, 2015). Los ácidos grasos de cadena corta están involucrados en el desarrollo óptimo del epitelio, tanto del hepatopáncreas como del intestino en camarones (Duan *et al*, 2017). En este caso, la dieta suplementada con agavina al 2 % ha mostrado un efecto prometedor en el rendimiento de *L. vannamei*, además de un enriquecimiento de algunos géneros que no han sido reportados como probióticos, lo que abre la posibilidad de poder evaluar el efecto y la actividad benéfica de éstos géneros en el cultivo de *L. vannamei* (Figura 38).

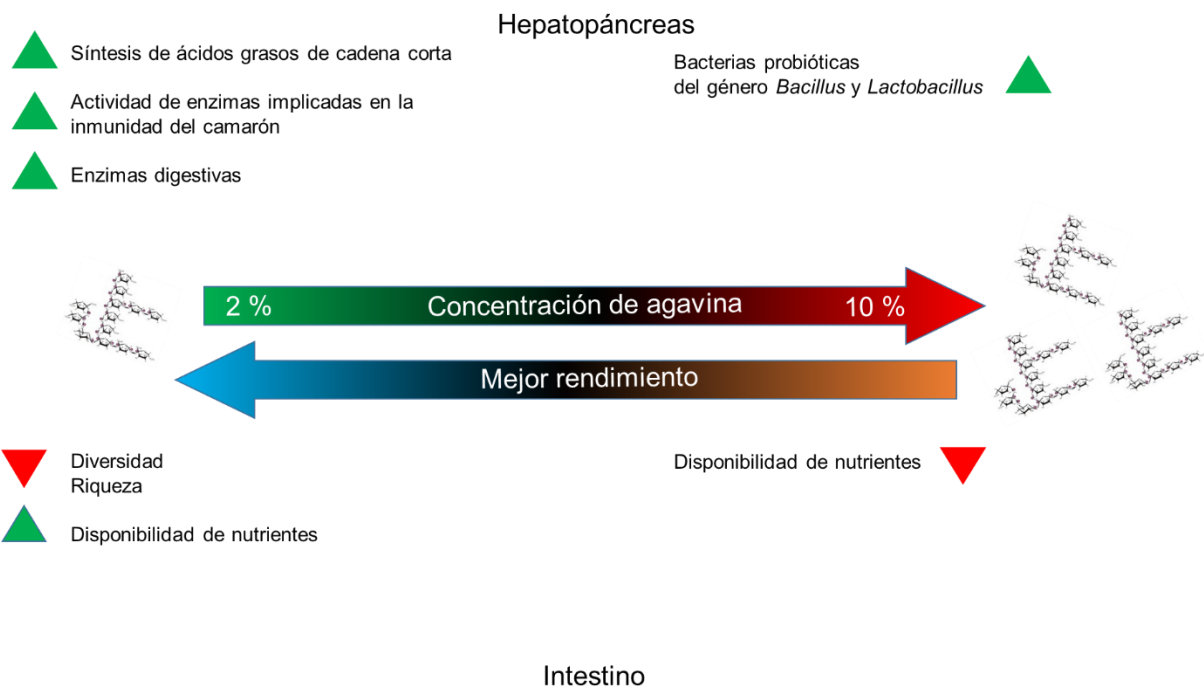


Figura 38. Mecanismo propuesto para explicar el efecto de la agavina, dependiente de concentración, tanto en hepatopáncreas como en intestino de *L. vannamei*.

## Referencias

1. Aguirre-Guzman, G., Sanchez-Martinez, J. G., Campa-Cordova, A. I., Luna-Gonzalez, A., & Ascencio, F. (2009). Penaeid shrimp immune system. *Thai J. Vet. Med*, 39(3), 205-215.
2. Alexandre, D., Ozório, R. A., Derner, R. B., Fracalossi, D. M., Oliveira, G. B., Samuels, R. I., ... & Silva, C. P. (2014). Spatial distribution of digestive proteinases in the midgut of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) indicates the existence of endo-ectoperitrophic circulation in Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 172, 90-95.
3. Andrino, K. G. S., Apines-Amar, M. J. S., Janeo, R. L., & Corre Jr, V. L. (2014). Effects of dietary mannan oligosaccharide (MOS) and b-glucan on growth, immune response and survival against white spot syndrome virus (WSSV) infection of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AACL Bioflux)*, 7(5).
4. Aronesty, E. (2013). Comparison of sequencing utility programs. *The open bioinformatics journal*, 7(1).
5. Bailey, J. S., Blankenship, L. C., & Cox, N. A. (1991). Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poultry Science*, 70(12), 2433-2438.
6. Barraza López, J. S. (2015). Análisis de variables predictivas para el Índice de Eficiencia de Producción utilizando alimentos comerciales para camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional, México.
7. Becattini, S., Taur, Y., and Pamer, E.G. 2016. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends Mol. Med.*22, 458–478.
8. Bier, A., Braun, T., Khasbab, R., Di Segni, A., Grossman, E., Haberman, Y., & Leibowitz, A. (2018). A high salt diet modulates the gut microbiota and short chain fatty acids production in a salt-sensitive hypertension rat model. *Nutrients*, 10(9), 1154.

9. Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., ... & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(1), 57-59.
10. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
11. Bolívar Ramírez, N., Seiffert, W. Q., Vieira, F. D. N., Mouriño, J. L. P., Jesus, G. F. A., Ferreira, G. S., & Andreatta, E. R. (2013). Prebiotic, probiotic, and symbiotic-supplemented diet for marine shrimp farming. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8), 913-919.
12. Bouhnik, Y., Raskine, L., Champion, K., Andrieux, C., Penven, S., Jacobs, H., & Simoneau, G. (2007). Prolonged administration of low-dose inulin stimulates the growth of bifidobacteria in humans. *Nutrition research*, 27(4), 187-193.
13. Burns, A. R., Stephens, W. Z., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J. F., Guillemin, K., & Bohannan, B. J. (2016). Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development. *The ISME journal*, 10(3), 655-664.
14. Calame, W., Weseler, A. R., Viebke, C., Flynn, C., & Siemensma, A. D. (2008). Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *British Journal of Nutrition*, 100(6), 1269-1275.
15. Cao, J., Wang, Z., Zhang, Y., Qu, F., Guo, L., Zhong, M., ... & Wang, X. (2014). Identification and characterization of the related immune-enhancing proteins in crab *Scylla paramamosain* stimulated with rhubarb polysaccharides. *Molecular immunology*, 57(2), 263-273.
16. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Huttley, G. A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335.
17. Carranza, C. O., Fernandez, A. Á., Armendáriz, G. R. B., & López-Munguía, A. (2015). Processing of fructans and oligosaccharides from Agave plants. In *Processing and impact on active components in food* (pp. 121-129). Academic Press.

18. Carraturo, A., Raieta, K., Ottaviani, D., & Russo, G. L. (2006). Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by a bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Vibrio mediterranei* 1. *Journal of applied microbiology*, 101(1), 234-241.
19. Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S., & Liao, I. C. (2000). Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(6), 505-514.
20. Chen, D., & Ainsworth, A. J. (1992). Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Journal of Fish Diseases*, 15(4), 295-304.
21. Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., & Wang, H. C. (2017). Microbiome dynamics in a shrimp grow-out pond with possible outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
22. Cheung, M. K., Yip, H. Y., Nong, W., Law, P. T. W., Chu, K. H., Kwan, H. S., & Hui, J. H. L. (2015). Rapid change of microbiota diversity in the gut but not the hepatopancreas during gonadal development of the new shrimp model *Neocaridina denticulata*. *Marine biotechnology*, 17(6), 811-819.
23. Clarke, G., Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2014). Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Molecular endocrinology*, 28(8), 1221-1238.
24. CONAPESCA. (2017). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México
25. CONAPESCA. (2018). Aumenta en 2017 la producción pesquera y acuícola nacional a 1.8 millones de toneladas: CONAPESCA. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México
26. Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Leonardo-Reza, M., Ochoa-Romo, J. P., & Ochoa-Leyva, A. (2018). A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. *PeerJ*, 6, e5382.
27. Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., ... & Ochoa-Leyva, A. (2017). Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition

- between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. Scientific reports, 7(1), 11783.
28. Corteel, M. (2013). White spot syndrome virus infection in *P. vannamei* and *M. rosenbergii*: experimental studies on susceptibility to infection and disease (Doctoral dissertation, Dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium. ISBN-number: 9789058643308).
  29. Costabile, A., Deaville, E. R., Morales, A. M., & Gibson, G. R. (2016). Prebiotic potential of a maize-based soluble fibre and impact of dose on the human gut microbiota. PLoS One, 11(1).
  30. Coudray, C., Demigne, C., & Rayssiguier, Y. (2003). Effects of dietary fibers on magnesium absorption in animals and humans. The Journal of nutrition, 133(1), 1-4.
  31. da Silva, B. C., Vieira, F. D. N., Mouriño, J. L. P., Bolivar, N., & Seiffert, W. Q. (2016). Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture research, 47(2), 612-623.
  32. Dai, W., Qiu, Q., Chen, J., & Xiong, J. (2019). Gut eukaryotic disease-discriminatory taxa are indicative of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) white feces syndrome. Aquaculture, 506, 154-160.
  33. Dall, W. Feeding, digestion and assimilation in Penaeidae. In: Allan, G. L.; Dall, W. eds, editor/s. Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop; April 15-17, 1991; Salamander Bay, NSW. 1991. 57-63.
  34. Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T. K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2006). Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. Appl. Environ. Microbiol., 72(9), 6419-6423.
  35. den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. Journal of lipid research, 54(9), 2325-2340.
  36. Deng, B., Wang, Z. P., Tao, W. J., Li, W. F., Wang, C., Wang, M. Q., ... & Wu, D. (2015). Effects of polysaccharides from mycelia of *C. oryzae* *sinensis* on



- growth performance, immunity and antioxidant indicators of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 21(2), 173-179.
37. Derrien, M., van Passel, M. W., van de Bovenkamp, J. H., Schipper, R., de Vos, W., & Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut microbes*, 1(4), 254-268.
  38. Duan, Y., Wang, Y., Liu, Q., Dong, H., Li, H., Xiong, D., & Zhang, J. (2019). Changes in the intestine microbial, digestion and immunity of *Litopenaeus vannamei* in response to dietary resistant starch. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
  39. Duan, Y., Zhang, Y., Dong, H., Wang, Y., & Zhang, J. (2017). Effects of dietary poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) on microbiota composition and the mTOR signaling pathway in the intestines of *litopenaeus vannamei*. *journal of microbiology*, 55(12), 946-954.
  40. Elizondo-González, R., Quiroz-Guzmán, E., Howe, A., Yang, F., Flater, J., Gemin, M., ... & Peña-Rodríguez, A. (2020). Changes on the intestinal bacterial community of white shrimp *Penaeus vannamei* fed with green seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 1-10.
  41. El-Sersy, N. A., AbdelRazek, F. A., & Taha, S. M. (2006). Evaluation of various probiotic bacteria for the survival of *Penaeus japonicus* larvae. *Fresenius Environmental Bulletin*, 15(12), 1506.
  42. Fan, J., Chen, L., Mai, G., Zhang, H., Yang, J., Deng, D., & Ma, Y. (2019). Dynamics of the gut microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
  43. Forte, J. M., Nogueira, L. F. F., dos Santos Rocha, R., Maggioni, R., & de Sousa, O. V. (2019). Multienzymatic capacity of cultivable intestinal bacteria from captive *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) shrimp reared in green water. *Aquaculture International*, 27(6), 1813-1824.
  44. Fung, T. C., Olson, C. A., & Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature neuroscience*, 20(2), 145.
  45. Gainza, O., & Romero, J. (2020). Effect of mannan oligosaccharides on the microbiota and productivity parameters of *Litopenaeus vannamei* shrimp under intensive cultivation in Ecuador. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.

46. Gao, C., Fu, Q., Su, B., Zhou, S., Liu, F., Song, L., ... & Li, C. (2016). Transcriptomic profiling revealed the signatures of intestinal barrier alteration and pathogen entry in turbot (*Scophthalmus maximus*) following *Vibrio anguillarum* challenge. *Developmental & Comparative Immunology*, 65, 159-168.
47. García-Curbelo, Y., Ayala, L., Bocourt, R., Albelo, N., Nuñez, O., Rodríguez, Y., & López, M. G. (2018). Agavins as prebiotic. Their influence on lipid metabolism of pigs. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(4).
48. García-Curbelo, Y., Bocourt, R., Savón, L. L., García-Vieyra, M. I., & López, M. G. (2015). Prebiotic effect of *Agave fourcroydes* fructans: an animal model. *Food & function*, 6(9), 3177-3182.
49. García-López, R., Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Sánchez-López, F., Cota-Huizar, A., Sotelo-Mundo, R. R., ... & Ochoa-Leyva, A. (2020). Doing More with Less: A Comparison of 16S Hypervariable Regions in Search of Defining the Shrimp Microbiota. *Microorganisms*, 8(1), 134.
50. Gerner-Smidt, P., Keiser-Nielsen, H., Dorsch, M., Stackebrandt, E., Ursing, J., Blom, J., ... & Holten-Andersen, W. (1994). *Lautropia mirabilis* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative motile coccus with unusual morphology isolated from the human mouth. *Microbiology*, 140(7), 1787-1797.
51. Gillett, R. (2008). *Global study of shrimp fisheries* (Vol. 475). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
52. Goarant, C., Herlin, J., Brizard, R., Marteau, A. L., Martin, C., & Martin, B. (2000). Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 40(2), 101-107.
53. González-Félix, M. L., Gatlin III, D. M., Urquidez-Bejarano, P., de la Reé-Rodríguez, C., Duarte-Rodríguez, L., Sánchez, F., ... & Perez-Velazquez, M. (2018). Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 491, 239-251.
54. González-Herrera, S. M., Rocha-Guzmán, N. E., Simental-Mendía, L. E., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C. N., Rutiaga-Quiñones, O. M., ... & Gamboa-Gómez, C. I. (2019b). Dehydrated apple-based snack supplemented with Agave

- fructans exerts prebiotic effect regulating the production of short-chain fatty acid in mice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(8), e14026.
55. González-Herrera, S. M., Simental-Mendía, L. E., López, M. G., Rocha-Guzmán, N. E., Rutiaga-Quiñones, O. M., Rodríguez-Herrera, R., & Gamboa-Gómez, C. I. (2019). Effect of agave fructans on the production of short chain fatty acid in mice. *Food science and biotechnology*, 28(5), 1493-1498.
56. Graue, J., Engelen, B., & Cypionka, H. (2012). Degradation of cyanobacterial biomass in anoxic tidal-flat sediments: a microcosm study of metabolic processes and community changes. *The ISME journal*, 6(3), 660-669.
57. Greger, J. L. (1999). Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *The Journal of nutrition*, 129(7), 1434S-1435S.
58. Guan, H., Yan, Y., Li, X., Li, X., Shuai, Y., Feng, G., ... & Zhang, X. (2018). Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China. *Bioresource technology*, 265, 282-290.
59. Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1-4), 1-14.
60. Gutiérrez-Dagnino, A., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P., Flores-Miranda, M. D. C., Miranda-Saucedo, S., ... & Escamilla-Montes, R. (2015). Efecto de la inulina y del ácido fúlvico en la supervivencia, crecimiento, sistema inmune y prevalencia de WSSV en *Litopenaeus vannamei*. *Latin american journal of aquatic research*, 43(5), 912-921.
61. Hao, K., Liu, J. Y., Ling, F., Liu, X. L., Lu, L., Xia, L., & Wang, G. X. (2014). Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 428, 141-149.
62. Hasyimi, W., Widanarni, W., & Yuhana, M. (2020). Growth Performance and Intestinal Microbiota Diversity in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Fed with a Probiotic Bacterium, Honey Prebiotic, and Synbiotic. *Current Microbiology*, 1-9.
63. Hoffman, J. D., Parikh, I., Green, S. J., Chlipala, G., Mohney, R. P., Keaton, M.,

- ... & Lin, A. L. (2017). Age drives distortion of brain metabolic, vascular and cognitive functions, and the gut microbiome. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 298.
64. Hoffman, J. D., Yanckello, L. M., Chlipala, G., Hammond, T. C., McCulloch, S. D., Parikh, I., ... & Lin, A. L. (2019). Dietary inulin alters the gut microbiome, enhances systemic metabolism and reduces neuroinflammation in an APOE4 mouse model. *PloS one*, 14(8), e0221828.
65. Hou, D., Huang, Z., Zeng, S., Liu, J., Wei, D., Deng, X., ... & He, J. (2018). Intestinal bacterial signatures of white feces syndrome in shrimp. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(8), 3701-3709.
66. Hu, X., Yang, H. L., Yan, Y. Y., Zhang, C. X., Ye, J. D., Lu, K. L., ... & Sun, Y. Z. (2018). Effects of fructooligosaccharide on growth, immunity and intestinal microbiota of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diets with fish meal partially replaced by soybean meal. *Aquaculture Nutrition*.
67. Huazano-García, A., & López, M. G. (2015). Agavins reverse the metabolic disorders in overweight mice through the increment of short chain fatty acids and hormones. *Food & function*, 6(12), 3720-3727.
68. Huazano-García, A., Shin, H., & López, M. G. (2017). Modulation of gut microbiota of overweight mice by agavins and their association with body weight loss. *Nutrients*, 9(9), 821.
69. Iwanek, J.D., Zagrodzki, P., Wozniakiewicz, M., Wozniakiewicz, A., Wcisło, M.Z., Winnicka, D., and Paśko, P. 2016. Procedure optimization for extracting short-chain fatty acids from human faeces. *J. Pharm. Biomed.* 124, 337–340.
70. Jaramillo-Torres, A., Rawling, M., Rodiles, A., Mikalsen, H. E., Johansen, L. H., Tinsley, J., ... & Merrifield, D. L. (2019). Influence of dietary supplementation of probiotic *Pediococcus acidilactici* MA18/5M during the transition from freshwater to seawater on intestinal health and microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Frontiers in microbiology*, 10, 2243.
71. Javadi, A., & Khatibi, S. A. (2017). Effect of commercial probiotic (Protexin®) on growth, survival and microbial quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Nutrition & Food Science*, 47(2), 204-216.

72. Jeon, C. O., Lim, J. M., Lee, J. M., Xu, L. H., Jiang, C. L., & Kim, C. J. (2005). Reclassification of *Bacillus haloalkaliphilus* Fritze 1996 as *Alkalibacillus haloalkaliphilus* gen. nov., comb. nov. and the description of *Alkalibacillus salilacus* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(5), 1891-1896.
73. Jiang, Q., Zhou, Z., Wang, L., Wang, L., Yue, F., Wang, J., & Song, L. (2013). A scallop nitric oxide synthase (NOS) with structure similar to neuronal NOS and its involvement in the immune defense. *PLoS One*, 8(7).
74. Joshi, A. A., Kanekar, P. P., Kelkar, A. S., Shouche, Y. S., Vani, A. A., Borgave, S. B., & Sarnaik, S. S. (2008). Cultivable bacterial diversity of alkaline Lonar Lake, India. *Microbial Ecology*, 55(2), 163-172.
75. Kakoolaki, S., Soltani, M., EBRAHIMZADEH, M. H., Sharifpour, I., Mirzargar, S., Afsharnasab, M., & Motalebi, A. A. (2011). The effect of different salinities on mortality and histopathological changes of SPF imported *Litopenaeus vannamei*, experimentally exposed to white spot virus and a new differential hemocyte staining method.
76. Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., & Núñez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature immunology*, 14(7), 685.
77. Kasai, H., Katsuta, A., Sekiguchi, H., Matsuda, S., Adachi, K., Shindo, K., ... & Shizuri, Y. (2007). *Rubritalea squalenifaciens* sp. nov., a squalene-producing marine bacterium belonging to subdivision 1 of the phylum 'Verrucomicrobia'. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(7), 1630-1634.
78. Kaushik, S. J., Coves, D., Dutto, G., & Blanc, D. (2004). Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 230(1-4), 391-404.
79. Koh, A., De, V.F., Kovatcheva-Datchary, P., and Bäckhed, F. 2016. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* 165, 1332–1345.

80. Kolida, S., Meyer, D., & Gibson, G. R. (2007). A double-blind placebo-controlled study to establish the bifidogenic dose of inulin in healthy humans. *European journal of clinical nutrition*, 61(10), 1189-1195.
81. Konecki, K., Gernold, M., Wensing, A., & Geider, K. (2013). Growth inhibition of *Erwinia amylovora* and related *Erwinia* species by neutralized short-chain fatty acids. *Archives of microbiology*, 195(10-11), 759-764.
82. Kumar, P., Sahu, N. P., Saharan, N., Reddy, A. K., & Kumar, S. (2006). Effect of dietary source and level of chitin on growth and survival of post-larvae *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(5), 363-368.
83. Lambertz, J., Weiskirchen, S., Landert, S., & Weiskirchen, R. (2017). Fructose: a dietary sugar in crosstalk with microbiota contributing to the development and progression of non-alcoholic liver disease. *Frontiers in immunology*, 8, 1159.
84. Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., ... & Leonard, P. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541-546.
85. Li, E., Xu, C., Wang, X., Wang, S., Zhao, Q., Zhang, M., ... & Chen, L. (2018). Gut microbiota and its modulation for healthy farming of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(3), 381-399.
86. Li, H., Xu, C., Zhou, L., Dong, Y., Su, Y., Wang, X., ... & Li, E. (2019). Beneficial effects of dietary  $\beta$ -glucan on growth and health status of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Fish & shellfish immunology*, 91, 315-324.
87. Li, P., Burr, G. S., Gatlin III, D. M., Hume, M. E., Patnaik, S., Castille, F. L., & Lawrence, A. L. (2007). Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *The Journal of nutrition*, 137(12), 2763-2768.
88. Li, Y., Liu, H., Dai, X., Li, J., & Ding, F. (2018b). Effects of dietary inulin and mannan oligosaccharide on immune related genes expression and disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 76, 78-92.

89. Lopez, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835-7840.
90. Luna-González, A., Almaraz-Salas, J. C., Fierro-Coronado, J. A., del Carmen Flores-Miranda, M., González-Ocampo, H. A., & Peraza-Gómez, V. (2012). The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture*, 362, 28-32.
91. Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832-7839.
92. Martínez Córdova, L. R., López Elías, J. A., Leyva Miranda, G., Armenta Ayón, L., & Martinez Porchas, M. (2011). Bioremediation and reuse of shrimp aquaculture effluents to farm whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: a first approach. *Aquaculture Research*, 42(10), 1415-1423
93. Martínez, F. S. (2007). The Immune system of shrimp. *Boletines Nicovita*.
94. McGaw, I. J., & Curtis, D. L. (2013). A review of gastric processing in decapod crustaceans. *Journal of Comparative Physiology B*, 183(4), 443-465.
95. Meshram, S. J., Murthy, H. S., Ali, H., Swain, H. S., & Ballyaya, A. (2015). Effect of dietary  $\beta$ -glucan on immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture International*, 23(2), 439-447.
96. Morovan, O., Jauneau, A., Morovan, C., Demarty, M., & Ripoll, C. (1988). Degradation of pectic substances in green flax fibre by *Erwinia carotovora*. *Annals of applied biology*, 112(1), 107-116.
97. Mueller, N. T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z., & Dominguez-Bello, M. G. (2015). The infant microbiome development: mom matters. *Trends in molecular medicine*, 21(2), 109-117.
98. Murthy, H. S., Li, P., Lawrence, A. L., & Gatlin III, D. M. (2009). Dietary  $\beta$ -glucan and nucleotide effects on growth, survival and immune responses of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of applied aquaculture*, 21(3), 160-168.

99. Naeem, S., & Li, S. (1997). Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature*, 390(6659), 507-509.
100. Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they?. *The Journal of nutrition*, 129(7), 1402S-1406S.
101. Niu, J., Xie, J. J., Guo, T. Y., Fang, H. H., Zhang, Y. M., Liao, S. Y., ... & Tian, L. X. (2019). Comparison and evaluation of four species of macro-algae as dietary ingredients in *Litopenaeus vannamei* under normal rearing and WSSV challenge conditions: effect on growth, immune response, and intestinal microbiota. *Frontiers in physiology*, 9, 1880.
102. Ogata, S., Shimizu, K., Tominaga, S., & Nakanishi, K. (2017). Immunohistochemical study of mucins in human intestinal spirochetosis. *Human pathology*, 62, 126-133.
103. Partida-Arangure, B. O., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J. A., del Carmen Flores-Miranda, M., & González-Ocampo, H. A. (2013). Effect of inulin and probiotic bacteria on growth, survival, immune response, and prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 12(21).
104. Pattarayingsakul, W., Pudgerd, A., Munkongwongsiri, N., Vanichviriyakit, R., Chaijarasphong, T., Thitamadee, S., & Kruangkum, T. (2019). The gastric sieve of penaeid shrimp species is a sub-micrometer nutrient filter. *Journal of Experimental Biology*, 222(10), jeb199638.
105. Peña-Rodríguez, A., Pelletier-Morreew, Z., García-Luján, J., Rodríguez-Jaramillo, M. D. C., Guzmán-Villanueva, L., Escobedo-Fregoso, C., ... & Reyes, A. G. (2020). Evaluation of Agave lechuguilla by-product crude extract as a feed additive for juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 51(4), 1336-1345.
106. Pourmozaffar, S., Hajimoradloo, A., & Miandare, H. K. (2017). Dietary effect of apple cider vinegar and propionic acid on immune related transcriptional responses and growth performance in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 60, 65-71.
107. Rahim, M. B. H. A., Chilloux, J., Martinez-Gili, L., Neves, A. L., Myridakis, A., Gooderham, N., & Dumas, M. E. (2019). Diet-induced metabolic changes of the



- human gut microbiome: importance of short-chain fatty acids, methylamines and indoles. *Acta diabetologica*, 56(5), 493-500.
108. Rao, A. V. (1999). Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. *The Journal of nutrition*, 129(7), 1442S-1445S.
  109. Rattanama, P., Thompson, J. R., Kongkerd, N., Srinithiwarawong, K., Vuddhakul, V., & Mekalanos, J. J. (2012). Sigma E regulators control hemolytic activity and virulence in a shrimp pathogenic *Vibrio harveyi*. *PLoS one*, 7(2).
  110. Resendis-Antonio, O., Reed, J. L., Encarnación, S., Collado-Vides, J., & Palsson, B. Ø. (2007). Metabolic reconstruction and modeling of nitrogen fixation in *Rhizobium etli*. *PLoS computational biology*, 3(10).
  111. Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S13-S25.
  112. Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A., & Gibson, G. R. (1998). The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *The Journal of nutrition*, 128(1), 11-19.
  113. Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172(1-2), 125-145.
  114. Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., & Stern, S. (2007). Exposure to probiotics and  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture*, 273(4), 405-415.
  115. Rószter, T. (2014). The invertebrate midintestinal gland ("hepatopancreas") is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell and tissue research*, 358(3), 685-695.
  116. Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., & Karoonuthaisiri, N. (2016). Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. *Journal of invertebrate pathology*, 133, 12-19.
  117. Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N. (2014). Characterization of intestinal

- bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). PloS one, 9(3), e91853.
118. Santiago-García, P. A., & López, M. G. (2014). Agavins from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* affect food intake, body weight gain and satiety-related hormones (GLP-1 and ghrelin) in mice. *Food & function*, 5(12), 3311-3319.
  119. Scheuermayer, M., Gulder, T. A., Bringmann, G., & Hentschel, U. (2006). *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the phylum 'Verrucomicrobia', isolated from a sponge (Porifera). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(9), 2119-2124.
  120. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, 12(6), R60.
  121. Shi, H., Xu, W. J., Xie, J. J., & Wang, G. S. (2017). Pathogenicity of *Penaeus vannamei* slow growth syndrome in intensively cultured penaeid shrimp in Zhoushan. *Journal of Fishery Sciences of China*, 24(2), 387-394.
  122. Simeoni, U., Berger, B., Junick, J., Blaut, M., Pecquet, S., Rezzonico, E., ... & Szajewska, H. (2016). Gut microbiota analysis reveals a marked shift to bifidobacteria by a starter infant formula containing a synbiotic of bovine milk-derived oligosaccharides and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CNCM I-3446. *Environmental microbiology*, 18(7), 2185-2195.
  123. Singh, A., Zapata, R. C., Pezeshki, A., Reidelberger, R. D., & Chelikani, P. K. (2018). Inulin fiber dose-dependently modulates energy balance, glucose tolerance, gut microbiota, hormones and diet preference in high-fat-fed male rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 59, 142-152.
  124. Sivagnanavelmurugan, M., Thaddaeus, B. J., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2014). Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 39(2), 439-449.
  125. Siwicki, A. K., Anderson, D. P., & Rumsey, G. L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection

- against furunculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 41(1-2), 125-139.
126. Song, J., Lim, Y., Joung, Y., Cho, J. C., & Kogure, K. (2018). *Rubritalea profunda* sp. nov., isolated from deep-seawater and emended description of the genus *Rubritalea* in the phylum *Verrucomicrobia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(4), 1384-1389.
127. Sousa, L. G., & Petriella, A. M. (2000). Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea). *Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica... et. al*, 24(3), 189-195.
128. Suo, Y., Li, E., Li, T., Jia, Y., Qin, J. G., Gu, Z., & Chen, L. (2017). Response of gut health and microbiota to sulfide exposure in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 63, 87-96.
129. Supungul, P., Jaree, P., Somboonwiwat, K., Junprung, W., Proespraiwong, P., Mavichak, R., & Tassanakajon, A. (2017). A potential application of shrimp antilipopopolysaccharide factor in disease control in aquaculture. *Aquaculture Research*, 48(3), 809-821.
130. Tapaamorndech, S., Chantarasakha, K., Kingcha, Y., Chaiyapechara, S., Phromson, M., Sriariyanun, M., ... & Visessanguan, W. (2019). Effects of *Bacillus aryabhatai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 86, 4-13.
131. Thompson, J., Gregory, S., Plummer, S., Shields, R. J., & Rowley, A. F. (2010). An in vitro and in vivo assessment of the potential of *Vibrio* spp. as probiotics for the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1177-1187.
132. Tuncil, Y. E., Thakkar, R. D., Marcia, A. D. R., Hamaker, B. R., & Lindemann, S. R. (2018). Divergent short-chain fatty acid production and succession of colonic microbiota arise in fermentation of variously-sized wheat bran fractions. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
133. Tzuc, J. T., Escalante, D. R., Herrera, R. R., Cortés, G. G., & Ortiz, M. L. A. (2014). Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial

- community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). SpringerPlus, 3(1), 280.
134. Van Weel, P. B. (1974). Hepatopancreas?. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 47(1), 1-9.
  135. Vogt, G. (1987). Monitoring of environmental pollutants such as pesticides in prawn aquaculture by histological diagnosis. Aquaculture, 67(1-2), 157-164.
  136. Vogt, G. (1996). Morphology and physiology of digestive epithelia in Decapod crustaceans. Pflügers Archiv, 431(6), R239-R240.
  137. Vogt, G. (2019). Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. Journal of morphology, 280(9), 1405-1444.
  138. Wagner-Döbler, I., & Biebl, H. (2006). Environmental biology of the marine Roseobacter lineage. Annu. Rev. Microbiol., 60, 255-280.
  139. Wall, R., Ross, R. P., Ryan, C. A., Hussey, S., Murphy, B., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2009). Role of gut microbiota in early infant development. Clinical medicine. Pediatrics, 3, CMPed-S2008.
  140. Wang, J., Huang, Y., Xu, K., Zhang, X., Sun, H., Fan, L., & Yan, M. (2019). White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition and function in *Litopenaeus vannamei*. Fish & shellfish immunology, 84, 130-137.
  141. Wang, Y. C., Hu, S. Y., Chiu, C. S., & Liu, C. H. (2019b). Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. Fish & shellfish immunology, 84, 1050-1058.
  142. Watling, L. (2013). Feeding and digestive system. The natural history of Crustacea, 1, 237-260.
  143. Wu, G., Yuan, C., Shen, M., Tang, J., Gong, Y., Li, D., ... & Han, X. (2007). Immunological and biochemical parameters in carp (*Cyprinus carpio*) after Qompsell feed ingredients for long-term administration. Aquaculture Research, 38(3), 246-255.
  144. Xiong, J., Dai, W., Zhu, J., Liu, K., Dong, C., & Qiu, Q. (2017). The underlying ecological processes of gut microbiota among cohabitating retarded, overgrown and normal shrimp. Microbial ecology, 73(4), 988-999.

145. Xiong, J., Wang, K., Wu, J., Qiuqian, L., Yang, K., Qian, Y., & Zhang, D. (2015). Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(16), 6911-6919.
146. Xiong, J., Zhu, J., Dai, W., Dong, C., Qiu, Q., & Li, C. (2017). Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. *Environmental microbiology*, 19(4), 1490-1501.
147. Yellowlees, D. (1998). Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis* (Decapoda: Scyllaridae). *Journal of Crustacean Biology*, 18(2), 271-278.
148. Yoon, J., Matsuda, S., Adachi, K., Kasai, H., & Yokota, A. (2011). *Rubritalea halochordaticola* sp. nov., a carotenoid-producing verrucomicrobial species isolated from a marine chordate. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(7), 1515-1520.
149. Yu, W., Wu, J. H., Zhang, J., Yang, W., Chen, J., & Xiong, J. (2018). A meta-analysis reveals universal gut bacterial signatures for diagnosing the incidence of shrimp disease. *FEMS microbiology ecology*, 94(10), fiy147.
150. Zhai, Q., Li, J., Feng, Y., & Ge, Q. (2019). Evaluation of combination effects of *Astragalus polysaccharides* and florfenicol against acute hepatopancreatic necrosis disease-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 86, 374-383.
151. Zheng, Y., Yu, M., Liu, J., Qiao, Y., Wang, L., Li, Z., ... & Yu, M. (2017). Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Frontiers in microbiology*, 8, 1362.
152. Zhou, L., Chen, C., Xie, J., Xu, C., Zhao, Q., Qin, J. G., ... & Li, E. (2019). Intestinal bacterial signatures of the “cotton shrimp-like” disease explain the change of growth performance and immune responses in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & shellfish immunology*, 92, 629-636.
153. Zhou, L., Fang, L., Sun, Y., Su, Y., & Zhu, W. (2017). Effects of a diet high in resistant starch on fermentation end-products of protein and mucin secretion in the colons of pigs. *Starch-Stärke*, 69(7-8), 1600032.

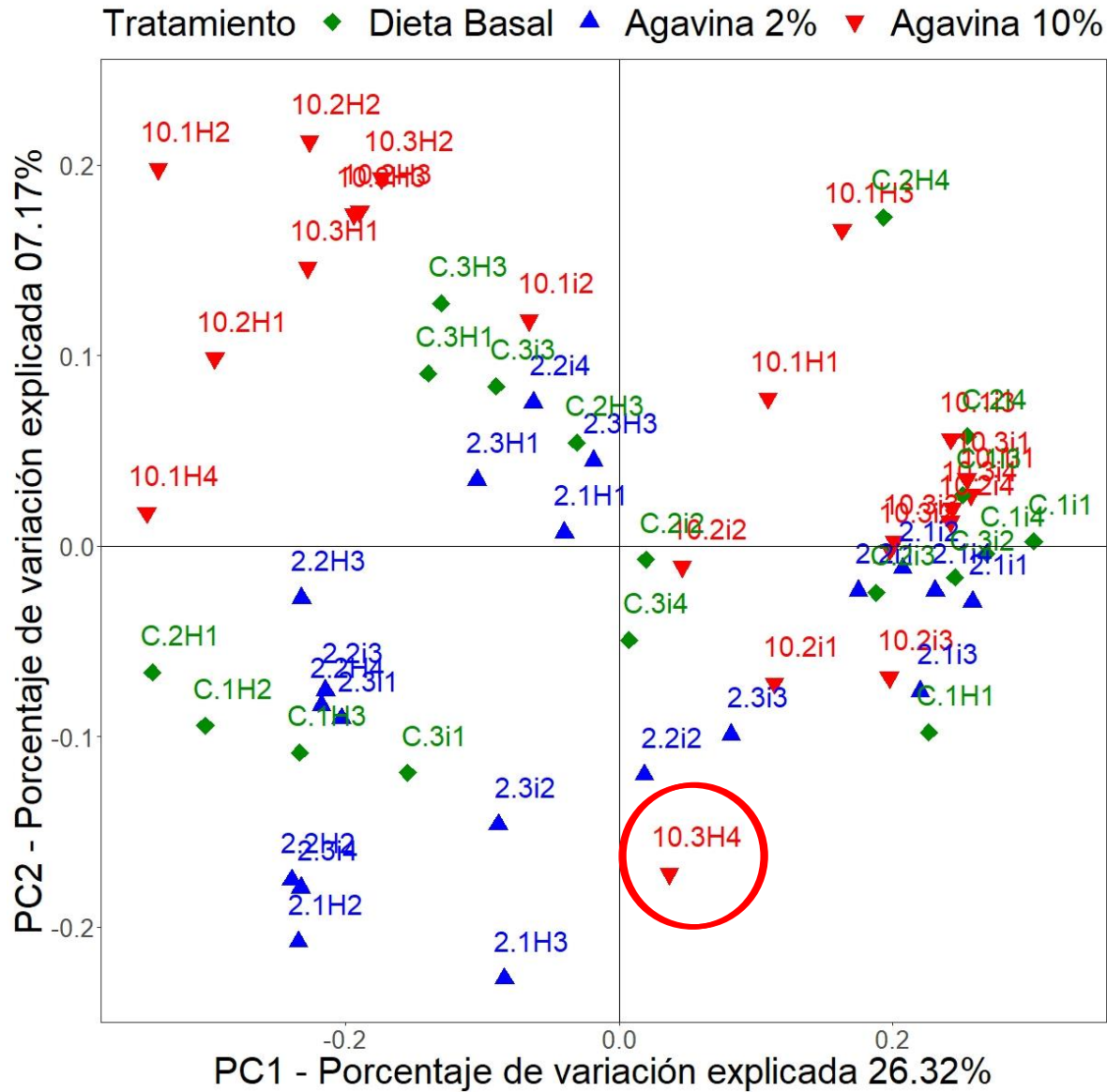
154. Zhou, L., Li, H., Qin, J. G., Wang, X., Chen, L., Xu, C., & Li, E. (2020). Dietary prebiotic inulin benefits on growth performance, antioxidant capacity, immune response and intestinal microbiota in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at low salinity. *Aquaculture*, 518, 734847.
155. Zhou, Y., Zhang, D., Peatman, E., Rhodes, M. A., Liu, J., & Davis, D. A. (2017). Effects of various levels of dietary copper supplementation with copper sulfate and copper hydroxychloride on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* performance and microbial communities. *Aquaculture*, 476, 94-105.
156. Zhou, Z., Ding, Z., & Huiyuan, L. V. (2007). Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2), 296-301.
157. Zhu, L., Liao, R., Tu, W., Lu, Y., & Cai, X. (2020). Pyrodextrin enhances intestinal function through changing the intestinal microbiota composition and metabolism in early weaned piglets. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-14.

## Índice de anexos

<b>Anexos .....</b>	<b>107</b>
<b>Anexo 1. Análisis de diversidad beta que incluye la muestra 10.3H4. A) <i>UniFrac unweighted</i>. B) <i>UniFrac weighted</i>.....</b>	<b>107</b>
<b>Anexo 2. Profundidad de cada una de las librerías que entraron al análisis y el número de lecturas que pasan cada uno de los procesos de filtrado de calidad</b>	<b>109</b>
<b>Anexo 3. Resultados de la diversidad alfa generados con la tabla BIOM con profundidad homologada.....</b>	<b>112</b>
<b>Anexo 4. Diversidad beta. Resultados calculados a partir de la tabla BIOM con profundidad homologada.....</b>	<b>113</b>
<b>Anexo 4.1. Los PCoA representan el análisis <i>UniFrac unweighted</i> (arriba) y <i>weighted</i> (abajo) de todas las muestras, identificadas por órgano.....</b>	<b>113</b>
<b>Anexo 4.2. Los PCoA representan el análisis <i>UniFrac unweighted</i> (arriba) y <i>weighted</i> (abajo) de todas las muestras identificadas por dieta experimental .</b>	<b>114</b>
<b>Anexo 4.3. Los PCoA representan el análisis <i>UniFrac unweighted</i> (arriba) y <i>weighted</i> (abajo) de los hepatopáncreas identificados por dieta experimental</b>	<b>115</b>
<b>Anexo 4.4. Los PCoA representan el análisis <i>UniFrac unweighted</i> (arriba) y <i>weighted</i> (abajo) de los intestinos identificados por dieta experimental .....</b>	<b>116</b>
<b>Anexo 5. Grupos diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de <i>LEfSe</i> a nivel de especie incluyendo aquellas no designadas.....</b>	<b>117</b>
<b>Anexo 5.1 Especies diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de <i>LEfSe</i> en los hepatopáncreas de los diferentes grupos: Arriba) DB vs A2. Abajo) DB vs A10 .....</b>	<b>117</b>
<b>Anexo 5.2 Especies diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de <i>LEfSe</i> en los intestinos de los diferentes grupos: Arriba) DB vs A2. Abajo) DB vs A10.....</b>	<b>123</b>
<b>Anexo 5.3 Especies diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de <i>LEfSe</i> de los diferentes grupos: Arriba) Hepatopáncreas A2 vs A10. Abajo) Intestinos A2 vs A10.....</b>	<b>125</b>
<b>Anexo 6. Especies probióticas y su presencia, tanto en Silva132 como en <i>Green genes 13,8</i>, así como aquellas especies que se logran asignar en cada una de las bases de datos.....</b>	<b>133</b>

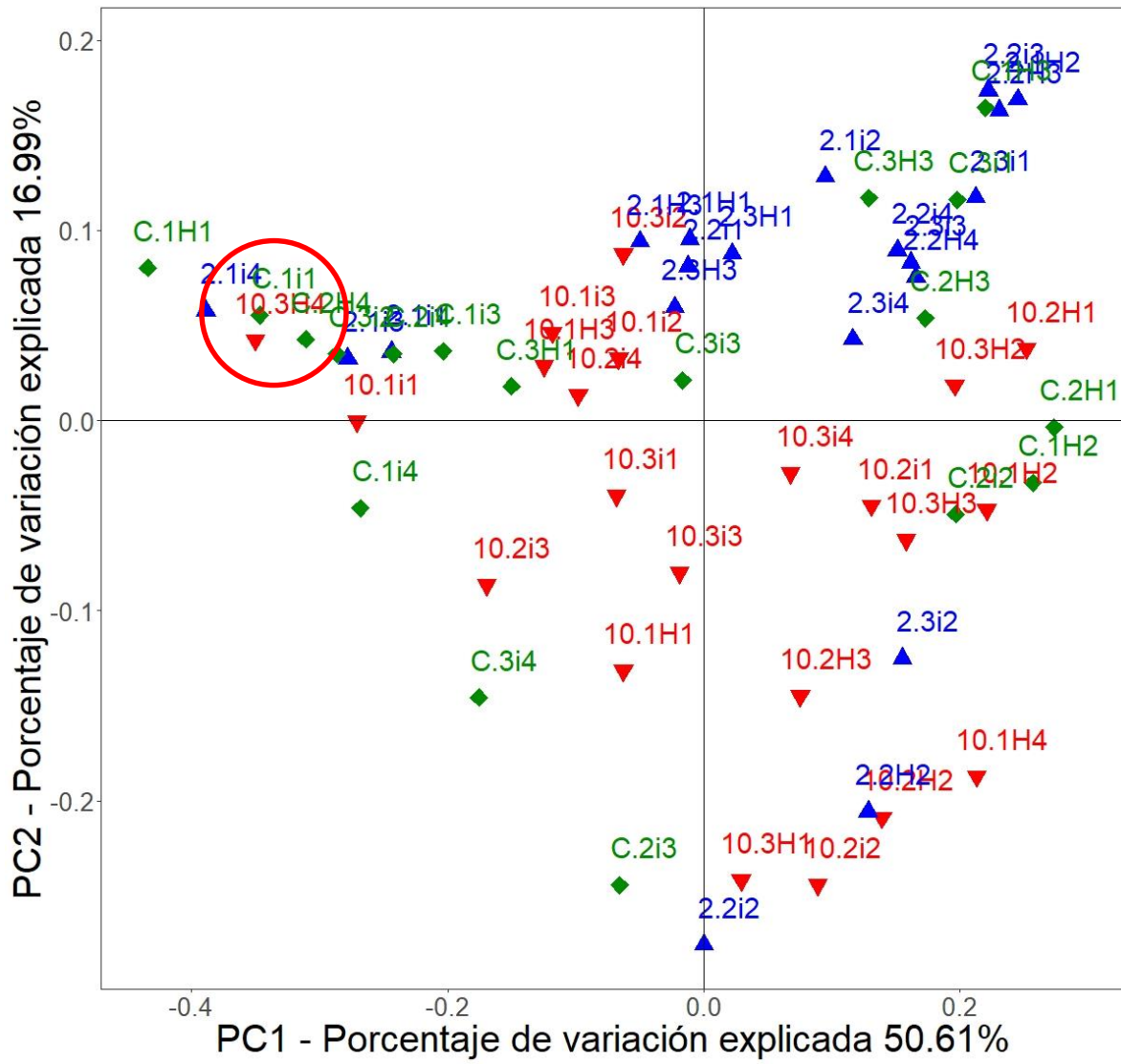
## Anexos

### Anexo 1. Análisis de diversidad beta que incluye la muestra 10.3H4. A) *UniFrac unweighted*. B) *UniFrac weighted*





Tratamiento ◆ Dieta Basal ▲ Agavina 2% ▼ Agavina 10%



**Anexo 2. Profundidad de cada una de las librerías que entraron al análisis y el número de lecturas que pasan cada uno de los procesos de filtrado de calidad**

Nombre de la muestra	Órgano	lecturas por muestra	Lecturas después de remover adaptadores	DB		Lecturas después de la calidad (Q > 20)	Lecturas asignadas	Lecturas asignadas después de los filtros
				Lecturas después de cortar a 231	Lecturas unidas			
C1H1	H	71376	71376	71376	52810	52764	36415	34678
C1H2	H	50730	50730	50730	46282	46232	25370	24773
C1H3	H	41254	41254	41254	34037	33988	26114	25355
C1H4	H	315	315	315	131	131	72	49
C1i1	I	73165	73165	73165	57204	57113	33056	30020
C1i2	I	501	501	501	258	257	121	77
C1i3	I	28607	28607	28607	22546	22513	12513	11213
C1i4	I	48889	48889	48889	40847	40791	27316	24571
C2H1	H	55038	55038	55038	49859	49817	28738	28135
C2H2	H	545	545	545	293	292	118	80
C2H3	H	15879	15879	15879	10926	10901	9263	8843
C2H4	H	24499	24499	24499	13470	13441	8826	7521
C2i1	I	10603	10603	10603	2962	2942	2372	2257
C2i2	I	18973	18973	18973	9160	9131	6290	5761
C2i3	I	62813	62813	62813	44036	43933	33386	31769
C2i4	I	46678	46678	46678	32105	32033	19704	16893
C3H1	H	15600	15600	15600	7636	7610	6499	6164
C3H2	H	267	267	267	130	130	63	50
C3H3	H	31153	31153	31153	26023	25985	19070	17592
C3H4	H	5928	5928	5928	4277	4266	3348	3290
C3i1	I	36023	36023	36023	25122	25064	18669	18240
C3i2	I	104191	104191	104191	88348	88195	55391	50587
C3i3	I	56619	56619	56619	37512	37417	27268	22594
C3i4	I	81828	81828	81828	69012	68888	53359	51771

DB: Dieta Basal. H: Hepatopáncreas. I: Intestino. La etiqueta de las muestras corresponde como sigue, por ejemplo, para la muestra C1H1: C = dieta basal; 1 = jaula 1; H = hepatopáncreas 1 = camarón 1, y así sucesivamente.

Nombre de la muestra	Órgano	A2						
		lecturas por muestra	Lecturas después del remover el adaptador	Lecturas después de cortar a 231	Lecturas unidas	Lecturas después de la calidad (Q > 20)	Lecturas asignadas	Lecturas asignadas después de los filtros
2-1H1	H	136590	136590	136590	112823	112605	88345	84286
2-1H2	H	51792	51792	51792	34566	34472	23866	23503
2-1H3	H	39053	39053	39053	30673	30621	25878	25381
2-1H4	H	13616	13616	13616	4100	4083	2803	2460
2-1i1	I	62698	62698	62698	50572	50482	32995	30616
2-1i2	I	53280	53280	53280	44924	44834	24929	23438
2-1i3	I	64802	64802	64802	56390	56306	39065	37638
2-1i4	I	46150	46150	46150	32836	32775	23729	22199
2-2H1	H	1664	1664	1664	360	357	224	191
2-2H2	H	68691	68691	68691	58292	58186	47265	46516
2-2H3	H	75038	75038	75038	63060	62954	51822	49768
2-2H4	H	63704	63704	63704	56066	56006	35099	34081
2-2i1	I	75232	75232	75232	65594	65476	34044	31375
2-2i2	I	31142	31142	31142	20231	20191	16014	15622
2-2i3	I	52561	52561	52561	36399	36309	22451	21064
2-2i4	I	36617	36617	36617	24686	24625	17033	15312
2-3H1	H	55121	55121	55121	46756	46693	30658	29486
2-3H2	H	8821	8821	8821	4842	4835	3880	3114
2-3H3	H	126999	126999	126999	118119	117965	88572	81253
2-3H4	H	311	311	311	149	148	79	65
2-3i1	I	42024	42024	42024	29211	29136	16776	15630
2-3i2	I	59133	59133	59133	43812	43723	33099	32154
2-3i3	I	31762	31762	31762	24734	24689	15540	14882
2-3i4	I	61953	61953	61953	48905	48827	33844	31513

A2: Agavina 2 %. H: Hepatopáncreas. I: Intestino. La etiqueta de las muestras corresponde como sigue, por ejemplo, para la muestra 2-1H1: 2 = Agavina 2 %; 1 = jaula 1; H = hepatopáncreas 1 = camarón 1, y así sucesivamente.

A10								
Nombre de la muestra	Órgano	lecturas por muestra	Lecturas después de remover adaptador	Lecturas después de cortar a 231	Lecturas unidas	Lecturas después de la calidad ( Q > 20)	Lecturas asignadas	Lecturas asignadas después de los filtros
10-1H1	H	32904	32904	32904	27082	27034	19249	17873
10-1H2	H	64531	64531	64531	39652	39557	31565	29665
10-1H3	H	49299	49299	49299	32786	32723	23350	20979
10-1H4	H	92734	92734	92734	63216	63103	51696	49726
10-1i1	I	77137	77137	77137	58183	58075	35350	31475
10-1i2	I	36225	36225	36225	12358	12298	8427	6878
10-1i3	I	54491	54491	54491	40839	40770	28275	25814
10-1i4	I	23354	23354	23354	5095	5069	3520	2826
10-2H1	H	23710	23710	23710	16295	16255	13111	12663
10-2H2	H	30107	30107	30107	17833	17791	13264	11861
10-2H3	H	51767	51767	51767	39526	39470	29197	26467
10-2H4	H	423	423	423	221	220	123	87
10-2i1	I	27384	27384	27384	23708	23663	18309	17686
10-2i2	I	48291	48291	48291	39543	39480	26714	25788
10-2i3	I	75281	75281	75281	63173	63094	45062	41630
10-2i4	I	93460	93460	93460	80324	80207	52888	44879
10-3H1	H	67905	67905	67905	48027	47950	39463	37323
10-3H2	H	17547	17547	17547	12233	12207	9902	9147
10-3H3	H	76429	76429	76429	59539	59461	49855	46211
10-3i1	I	49641	49641	49641	37971	37917	23518	21181
10-3i2	I	68695	68695	68695	56678	56564	41330	38785
10-3i3	I	47723	47723	47723	36354	36309	25338	23768
10-3i4	I	109659	109659	109659	93490	93348	62488	56569

A10: Agavina 10 %. H: Hepatopáncreas. I: Intestino. La etiqueta de las muestras corresponde como sigue, por ejemplo, para la muestra 10-1H1: 2 = Agavina 10%; 1 = jaula 1; H = hepatopáncreas 1 = camarón 1, y así sucesivamente.

**Anexo 3. Resultados de la diversidad alfa generados con la tabla BIOM con profundidad homologada**

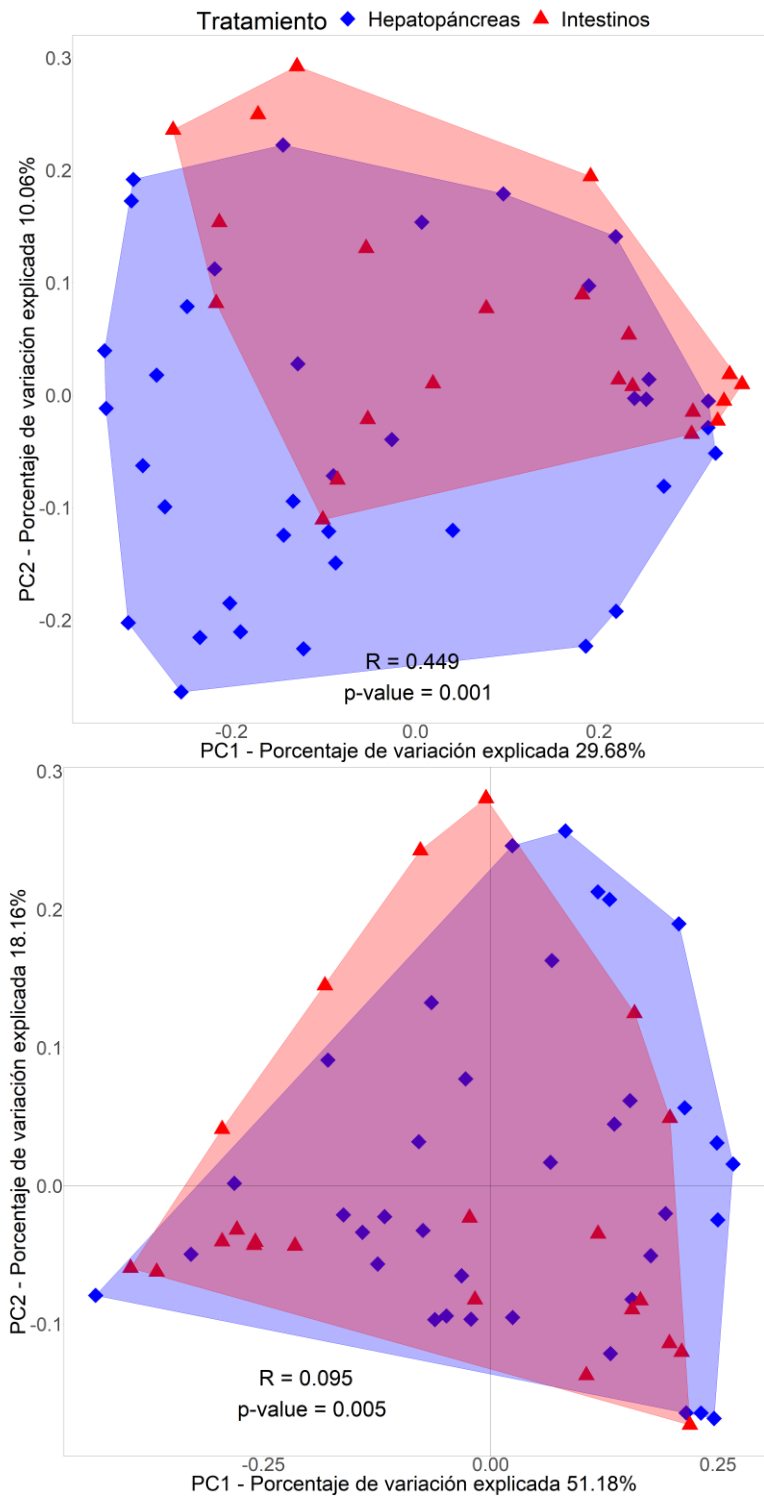
	<b>DB</b>	<b>A2</b>	<b>A10</b>	<b>DB vs A2</b>	<b>DB vs A10</b>
Chao1	293.50 ± 91.89	237.86 ± 94.01	318.65 ± 99.44	0.0779	0.415
<i>OTUs</i> observados	216.78 ± 82.28	161.49 ± 64.49	231.20 ± 76.40	0.0262	0.5492
Shannon	4.80 ± 1.14	3.98 ± 0.83	5.06 ± 0.96	0.01202	0.41562
DF	17.86 ± 5.24	13.82 ± 4.56	18.74 ± 4.71	0.0125	0.5746

	<b>DB</b>	<b>A2</b>	<b>A10</b>	<b>DB vs A2</b>	<b>DB vs A10</b>
Chao1	240.61 ± 92.56	204.13 ± 77.82	262.24 ± 84.54	0.40068	0.59862
<i>OTUs</i> observados	171.82 ± 81.19	131.83 ± 48.49	190.56 ± 65.52	0.23846	0.55851
Shannon	4.12 ± 0.97	3.80 ± 0.67	4.65 ± 0.91	0.48809	0.21631
DF	15.36 ± 5.55	11.99 ± 3.16	16.34 ± 4.23	0.13806	0.64582

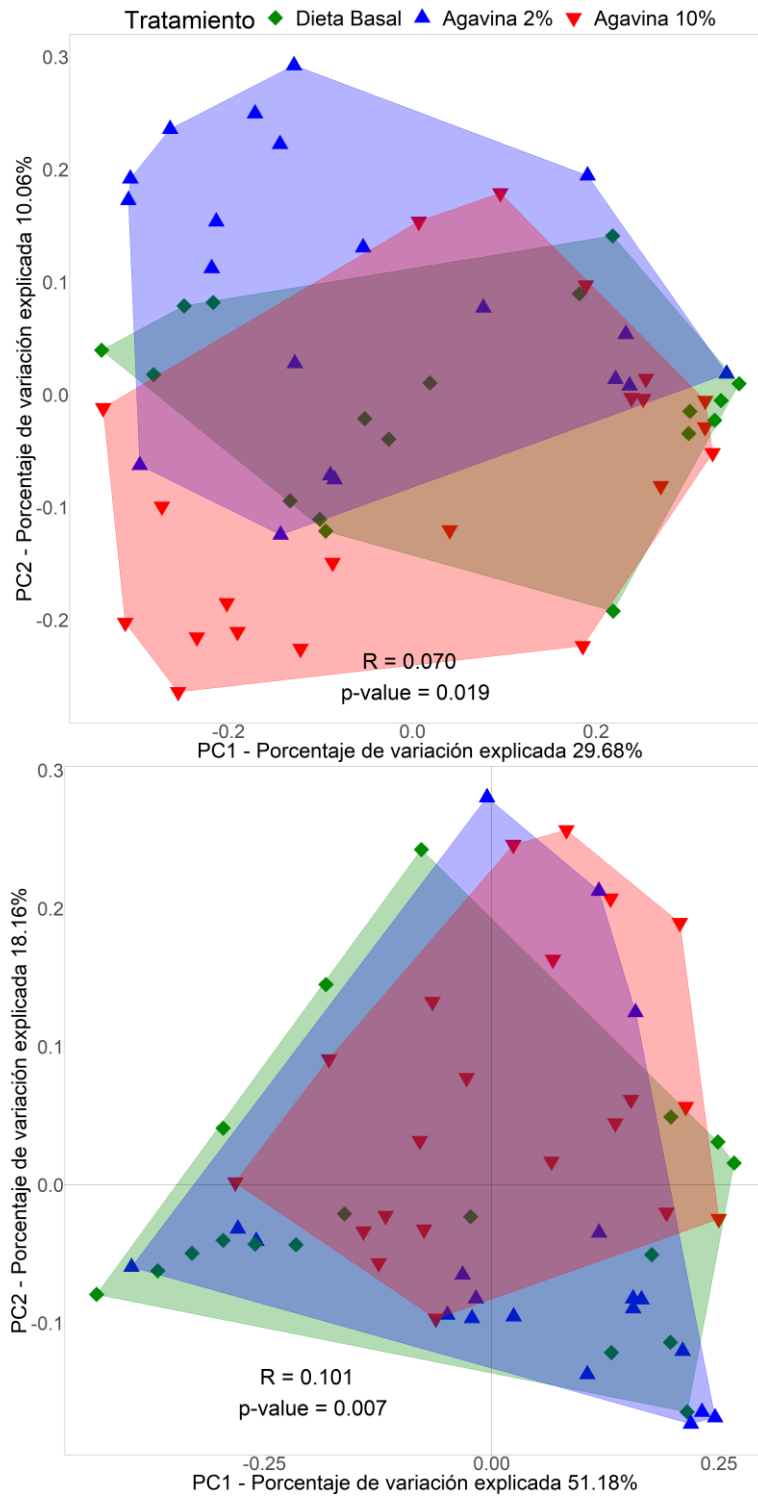
	<b>DB</b>	<b>A2</b>	<b>A10</b>	<b>DB vs A2</b>	<b>DB vs A10</b>
Chao1	335.81 ± 69.36	260.34 ± 100.16	369.94 ± 85.26	0.04565	0.36857
<i>OTUs</i> observados	252.75 ± 66.53	181.26 ± 67.97	268.15 ± 68.25	0.01599	0.60134
Shannon	5.35 ± 0.98	4.09 ± 0.93	5.43 ± 0.88	0.00204	0.84264
DF	19.87 ± 4.22	15.03 ± 5.05	20.92 ± 4.15	0.01467	0.59224

Anexo 4. Diversidad beta. Resultados calculados a partir de la tabla BIOM con profundidad homologada

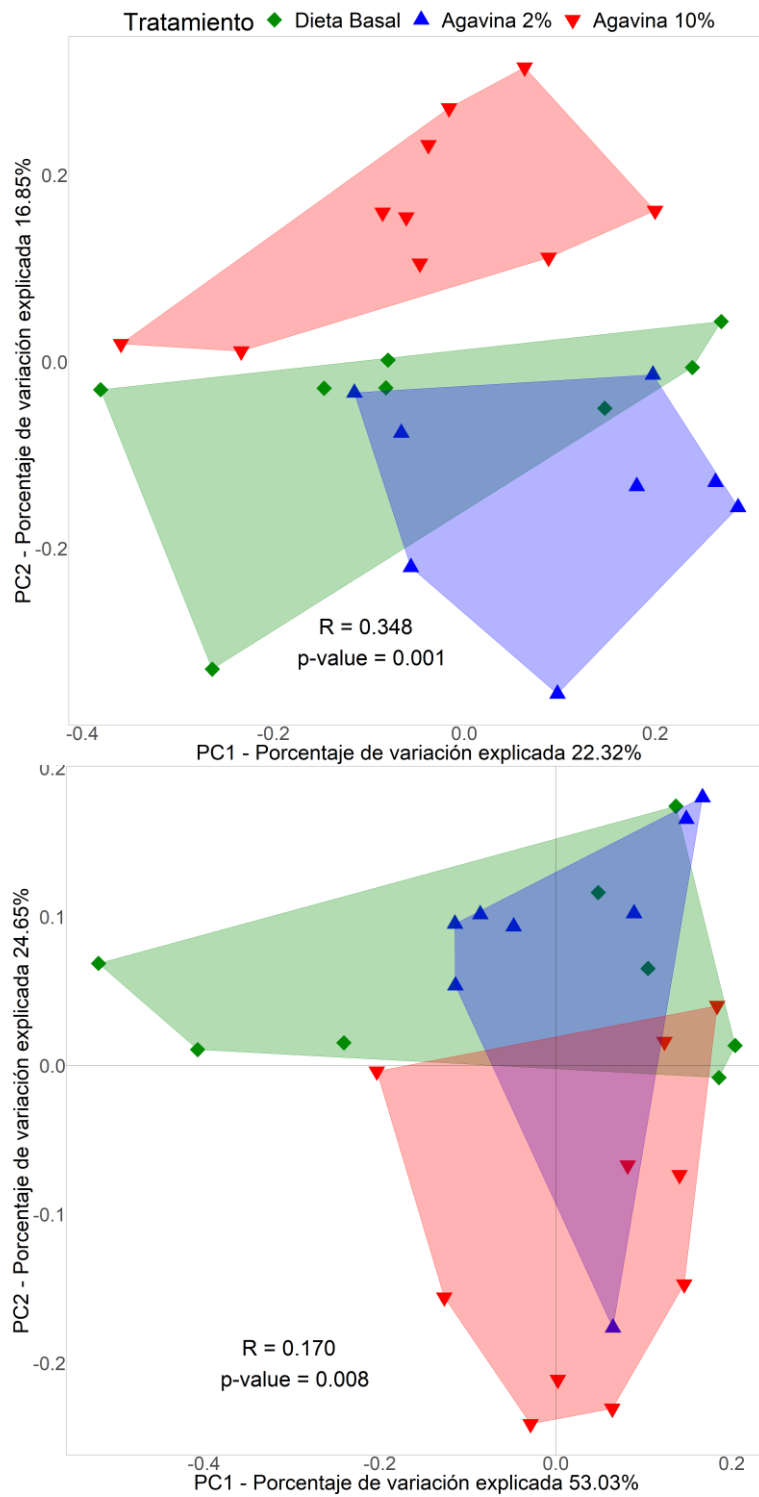
Anexo 4.1. Los PCoA representan el análisis *UniFrac unweighted* (arriba) y *weighted* (abajo) de todas las muestras, identificadas por órgano



Anexo 4.2. Los PCoA representan el análisis *UniFrac unweighted* (arriba) y *weighted* (abajo) de todas las muestras identificadas por dieta experimental

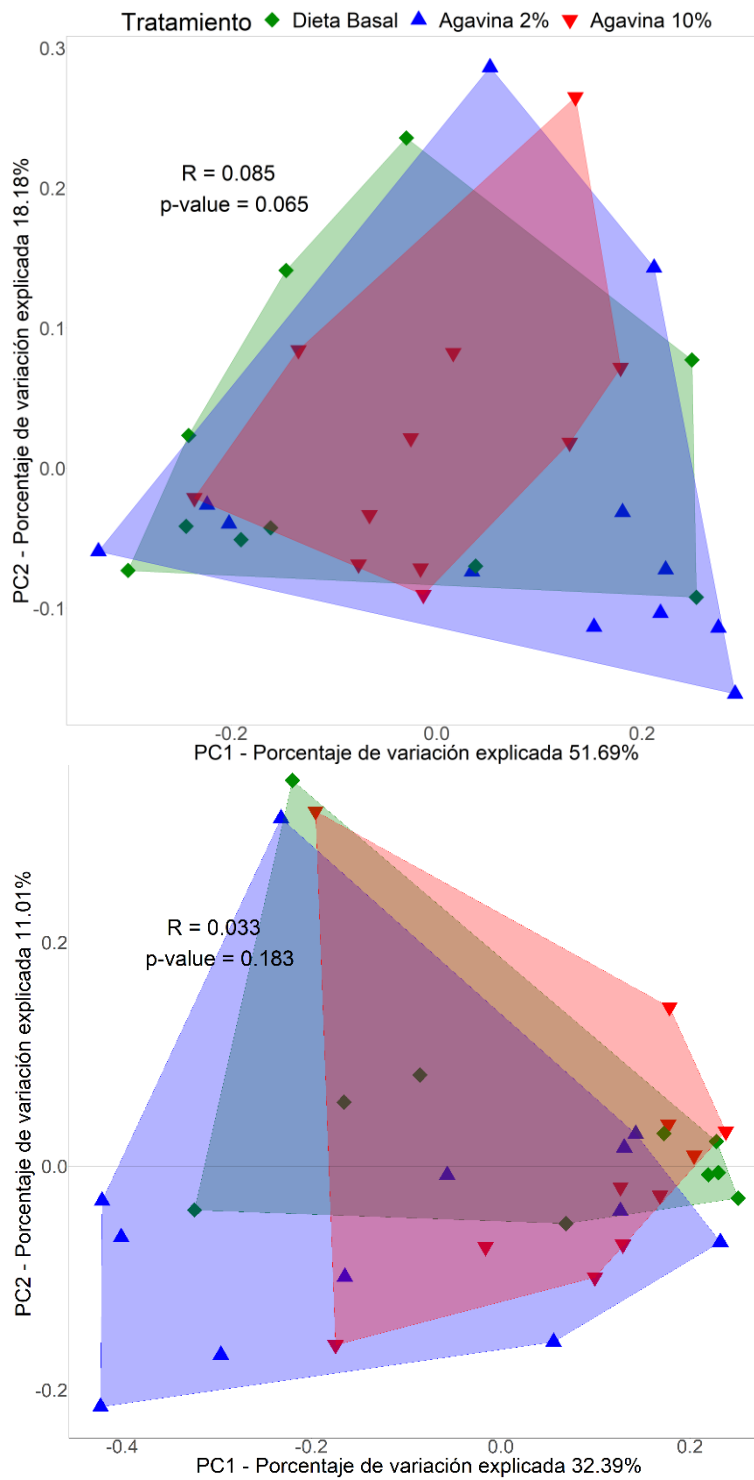


Anexo 4.3. Los PCoA representan el análisis *UniFrac unweighted* (arriba) y *weighted* (abajo) de los hepatopáncreas identificados por dieta experimental





Anexo 4.4. Los PCoA representan el análisis *UniFrac unweighted* (arriba) y *weighted* (abajo) de los intestinos identificados por dieta experimental



**Anexo 5. Grupos diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de LfSe a nivel de especie incluyendo aquellas no designadas**

**Anexo 5.1 Especies diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de LfSe en los hepatopáncreas de los diferentes grupos: Arriba) DB vs A2. Abajo) DB vs A10**

DB vs A2				
Nivel taxonómico	Taxonomía	Grupo con mayor abundancia	LDA Score (Log10)	p-value
Clase	Phycisphaerae	A2	2.095636401	0.044038204
Orden	c_Alphaproteobacteria, o_ND	A2	3.344440289	0.024034519
	Phycisphaerales	A2	3.146918105	0.044038204
	Rhizobiales	A2	4.360036287	0.005583617
	Rhodocyclales	A2	3.337907775	0.003492882
	Streptophyta	A2	3.456394686	0.009625985
Familia	Bradyrhizobiaceae	A2	4.139057748	0.000147419
	Brucellaceae	A2	2.821728585	0.006040466
	Burkholderiaceae	A2	3.185264154	0.000900809
	c_Alphaproteobacteria, f_ND	A2	3.103799237	0.024034519
	Methylobacteriaceae	A2	4.105292645	0.000169261
	o_Phycisphaerales, f_ND	A2	2.439144912	0.044038204
	o_Rhizobiales, f_ND	A2	3.527784359	0.001597552
	o_Sphingomonadales, f_ND	A2	2.995848323	0.002045677
	o_Streptophyta, f_ND	A2	3.23703585	0.009625985
	Rhizobiaceae	A2	3.140002318	0.031909312
Rhodocyclaceae	A2	2.965391954	0.003492882	
Género	Bradyrhizobium	A2	4.128829886	0.000186915
	Erwinia	A2	2.965580929	0.01204056
	Sinorhizobium	A2	2.904207862	0.046885437
	c_Alphaproteobacteria, g_ND	A2	3.076758854	0.024034519
	Enterovibrio	A2	2.649790865	0.044163117
	Rubritalea	A2	2.816489017	0.005226477
	o_Sphingomonadales, g_ND	A2	2.887534624	0.002045677
	f_Burkholderiaceae, g_ND	A2	2.904925042	0.000900809
	Ralstonia	A2	3.400435415	0.000186915
	f_Bradyrhizobiaceae, g_ND	A2	2.696347137	0.00071369

	Lautropia	A2	2.999593912	0.025869279
	o_Streptophyta, g_ND	A2	3.198772473	0.009625985
	Anoxybacillus	A2	2.837105726	0.045125519
	Bosea	A2	2.881731272	0.000959722
	Novosphingobium	A2	3.094339518	0.000262363
	f_Rhodocyclaceae, g_ND	A2	2.804998198	0.003492882
	o_Phycisphaerales, g_ND	A2	2.370373479	0.044038204
	Ochrobactrum	A2	2.84047086	0.006040466
	Methylobacterium	A2	4.10820357	0.000169261
	Aquabacterium	A2	2.959870678	0.005841887
	o_Rhizobiales, g_ND	A2	3.495575272	0.001597552
	Rhizobium	A2	2.800265219	0.000900809
Especie	Rhizobium leguminosarum	A2	2.765376671	0.000900809
	g_Methylobacterium, s_ND	A2	4.10773712	0.000169261
	g_Ochrobactrum, s_ND	A2	2.991156346	0.006040466
	o_Rhizobiales, s_ND	A2	3.49290404	0.001597552
	g_Erwinia, s_ND	A2	2.930287491	0.01204056
	g_Aquabacterium, s_ND	A2	2.949961652	0.005841887
	g_Rubritalea, s_ND	A2	2.823360593	0.005226477
	o_Sphingomonadales, s_ND	A2	2.784758252	0.002045677
	g_Novosphingobium, s_ND	A2	3.093113871	0.000262363
	f_Rhodocyclaceae, s_ND	A2	2.887305156	0.003492882
	g_Ralstonia, s_ND	A2	3.397100547	0.000186915
	g_Enterovibrio, s_ND	A2	2.650481752	0.044163117
	Vibrio shilonii	A2	2.918708687	0.026341644
	c_Alphaproteobacteria, s_ND	A2	3.076405616	0.024034519
	g_Sinorhizobium, s_ND	A2	2.873669568	0.046885437
	Anoxybacillus kestanbolensis	A2	3.029919215	0.045125519
	Bosea genosp	A2	2.891576987	0.000959722
	f_Burkholderiaceae, s_ND	A2	2.895680903	0.000900809
	o_Phycisphaerales, s_ND	A2	2.472510736	0.044038204
	o_Streptophyta, s_ND	A2	3.179938345	0.009625985
	g_Bradyrhizobium, s_ND	A2	4.126778493	0.000186915
	f_Bradyrhizobiaceae, s_ND	A2	2.699775735	0.00071369
	g_Lautropia, s_ND	A2	3.008149408	0.025869279

DB vs A10				
Nivel taxonómico	Taxonomía	Grupo con mayor abundancia	LDA Score (Log10)	p-value
Fila	Acidobacteria	A10	4.72998581	0.041238979
	Bacteroidetes	A10	4.301363938	0.006714283
	Fusobacteria	A10	4.83833261	0.006768741
	Cyanobacteria	DB	4.78173573	0.016382353
Clase	Betaproteobacteria	A10	4.231733097	0.026715698
	BPC102	A10	3.86965572	0.041238979
	Flavobacteriia	A10	3.817305036	0.005731182
	Fusobacteriia	A10	4.837849057	0.006768741
	ML635J 21	DB	3.576108613	0.048342273
	Synechococcophycideae	DB	4.66623632	0.011623419
Orden	Aeromonadales	A10	3.70244893	0.005601449
	Burkholderiales	A10	4.172686393	0.013823024
	c_Alphaproteobacteria, o_ND	A10	2.984955957	0.030401211
	c_Gammaproteobacteria, o_ND	A10	3.094784583	0.033827776
	Flavobacteriales	A10	3.646915966	0.005731182
	Fusobacteriales	A10	4.826771723	0.006768741
	Lactobacillales	A10	3.062023736	0.018754269
	MVS 40	A10	3.237706357	0.041238979
	Oceanospirillales	A10	3.115343645	0.008324725
	Pseudomonadales	A10	4.269786834	0.006768741
	Rhodospirillales	A10	3.023275759	0.036204238
	Thiotrichales	A10	3.08496003	0.011623419
	c_Betaproteobacteria, o_ND	DB	3.173239292	0.046953833
	c_ML635J 21, o_ND	DB	3.094827863	0.048342273
Synechococcales	DB	4.592630461	0.009740122	
Familia	Burkholderiaceae	A10	3.044776922	0.001469921
	Oxalobacteraceae	A10	4.197551248	0.002083615
	Alcaligenaceae	A10	3.576281311	0.008039299
	c_Gammaproteobacteria, f_ND	A10	3.58126093	0.033827776
	Rhodospirillaceae	A10	2.88601043	0.041044327
	Weeksellaceae	A10	3.087463896	0.012538671
	Alcanivoracaceae	A10	3.428921081	0.030967527
	Exiguobacteraceae	A10	4.192568501	0.000294507
	Piscirickettsiaceae	A10	3.071365703	0.011623419

	o_MVS 40, f_ND	A10	3.535998648	0.041238979
	Aeromonadaceae	A10	3.711336814	0.025968968
	Bradyrhizobiaceae	A10	3.684382323	0.036969618
	Lachnospiraceae	A10	3.149874794	0.039501618
	c_Alphaproteobacteria, f_ND	A10	3.029487056	0.030401211
	Oceanospirillaceae	A10	3.423168872	0.002226925
	Prevotellaceae	A10	3.008662039	0.025968968
	Lactobacillaceae	A10	3.173319968	0.001205823
	Pseudomonadaceae	A10	4.190913804	0.004628622
	Flavobacteriaceae	A10	3.633529656	0.006027692
	o_Rhodospirillales, f_ND	A10	3.887790824	0.016836074
	Shewanellaceae	A10	3.152629351	0.042297764
	Planococcaceae	A10	3.089362075	0.000221979
	Fusobacteriaceae	A10	4.818229337	0.006768741
	c_Betaproteobacteria, f_ND	DB	3.104745796	0.046953833
	c_ML635J 21, f_ND	DB	3.134059842	0.048342273
	Synechococcaceae	DB	4.622467225	0.009740122
Género	Paracoccus	A10	2.252034589	0.036426763
	Propionigenium	A10	4.782120855	0.006768741
	Agrobacterium	A10	2.417831413	0.038330695
	Bradyrhizobium	A10	3.738126309	0.036969618
	f_Piscirickettsiaceae, g_ND	A10	2.875032145	0.011623419
	Flavobacterium	A10	3.540682014	0.002296756
	Hydrogenophaga	A10	2.730812065	0.011400962
	c_Gammaproteobacteria, g_ND	A10	2.483352408	0.033827776
	Erwinia	A10	2.768487734	0.004768617
	Rummeliibacillus	A10	2.906002784	0.000221979
	Prevotella	A10	2.831721077	0.025968968
	c_Alphaproteobacteria, g_ND	A10	2.51349585	0.030401211
	c_BPC102 o, g_ND	A10	2.722876157	0.041238979
	Novispirillum	A10	2.424624346	0.018932273
	f_Aeromonadaceae, g_ND	A10	3.777019768	0.025968968
	Exiguobacterium	A10	4.091766201	0.000294507
	Achromobacter	A10	2.299362472	0.008039299
	Shewanella	A10	2.834816892	0.042297764
	Rubritalea	A10	3.053131864	0.01275159
	Psychrilyobacter	A10	3.731543495	0.001984081
	Oceanospirillum	A10	2.950522358	0.024875115

	f_Bradyrhizobiaceae, g_ND	A10	2.332059463	0.031478867
	Lautropia	A10	2.484963868	0.00186673
	Stappia	A10	2.472449803	0.042794046
	Ruminococcus	A10	2.599316943	0.039501618
	Enhydrobacter	A10	3.538252061	0.022106814
	Herminiimonas	A10	3.104070033	0.003854191
	Lactobacillus	A10	2.978053155	0.001205823
	f_Moraxellaceae, g_ND	A10	2.44844304	0.004131344
	Pseudomonas	A10	4.148121765	0.006040466
	Cloacibacterium	A10	2.840007192	0.00186673
	Janthinobacterium	A10	4.105406992	0.004090439
	Alcanivorax	A10	2.45926565	0.030967527
	f_Oceanospirillaceae, g_ND	A10	2.650135686	0.001152186
	Rhizobium	A10	2.302851672	0.014102749
	o_Rhodospirillales, g_ND	A10	2.682221967	0.016836074
	Alteromonas	A10	2.406305947	0.046411079
	c_Betaproteobacteria, g_ND	DB	2.960388158	0.046953833
	c_ML635J 21, g_ND	DB	3.007973417	0.048342273
	Synechococcus	DB	4.604482817	0.009740122
Especie	Rhizobium leguminosarum	A10	2.341761732	0.014102749
	Pseudomonas veronii	A10	2.972124045	0.024322916
	g_Pseudomonas, s_ND	A10	4.148073852	0.002988672
	o_MVS 40, s_ND	A10	2.812524085	0.041238979
	g_Herminiimonas, s_ND	A10	3.113928864	0.003854191
	Stappia meyeriae	A10	2.390644336	0.042794046
	Flavobacterium succinicans	A10	2.836265385	0.000513615
	g_Erwinia, s_ND	A10	2.73916762	0.004768617
	Staphylococcus aureus	A10	2.524003187	0.018881796
	g_Novispirillum, s_ND	A10	2.346161815	0.018932273
	g_Rubritalea, s_ND	A10	3.041786627	0.01275159
	Janthinobacterium lividum	A10	4.120773028	0.004090439
	g_Lactobacillus, s_ND	A10	3.021861519	0.001205823
	g_Shewanella, s_ND	A10	2.880703839	0.042297764
	Prevotella copri	A10	2.849651427	0.025968968
	Ruminococcus gnavus	A10	2.629289501	0.039501618
	f_Moraxellaceae, s_ND	A10	2.470487959	0.004131344
	o_Rhodospirillales, s_ND	A10	2.896776354	0.016836074
	Vibrio shilonii	A10	2.37530758	0.028923039

f_Oceanospirillaceae, s_ND	A10	2.641764033	0.001152186
f_Piscirickettsiaceae, s_ND	A10	2.985730928	0.011623419
c_Alphaproteobacteria, s_ND	A10	2.518109691	0.030401211
Paracoccus marcusii	A10	2.217247906	0.036426763
g_Agrobacterium, s_ND	A10	2.415451105	0.038330695
g_Enhydrobacter, s_ND	A10	3.560977568	0.022106814
Acinetobacter lwoffii	A10	2.703905043	0.019902373
f_Aeromonadaceae, s_ND	A10	3.735195496	0.025968968
g_Cloacibacterium, s_ND	A10	2.900040877	0.00186673
g_Alcanivorax, s_ND	A10	2.419072707	0.030967527
g_Alteromonas, s_ND	A10	2.267627192	0.046411079
g_Hydrogenophaga, s_ND	A10	2.71830282	0.011400962
c_Gammaproteobacteria, s_ND	A10	2.569086166	0.033827776
Enhydrobacter aerosaccus	A10	2.408131659	0.014421779
g_Bradyrhizobium, s_ND	A10	3.725010206	0.036969618
g_Flavobacterium, s_ND	A10	3.500656174	0.00282613
g_Exiguobacterium, s_ND	A10	4.13960266	0.000294507
g_Rummeliibacillus, s_ND	A10	2.953285074	0.000221979
Acinetobacter johnsonii	A10	3.097932909	0.003785398
f_Bradyrhizobiaceae, s_ND	A10	2.295179502	0.031478867
g_Oceanospirillum, s_ND	A10	2.972468927	0.024875115
g_Lautropia, s_ND	A10	2.530418942	0.00186673
g_Psychrilyobacter, s_ND	A10	3.743463168	0.001984081
g_Achromobacter, s_ND	A10	2.381884242	0.008039299
g_Propionigenium, s_ND	A10	4.784210178	0.006768741
c_Betaproteobacteria, s_ND	DB	3.031704121	0.046953833
c_ML635J 21, s_ND	DB	3.048292859	0.048342273
g_Synechococcus, s_ND	DB	4.63285594	0.009740122

**Anexo 5.2 Especies diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de LEfSe en los intestinos de los diferentes grupos: Arriba) DB vs A2. Abajo) DB vs A10**

DB vs A2				
Nivel taxonómico	Taxonomía	Grupo con mayor abundancia	LDA Score (Log10)	p-value
Fila	Cyanobacteria	DB	4.999946625	0.04964723
Clase	Bacilli	DB	3.638615992	0.04964723
	Bacteroidia	DB	2.77523868	0.03276918
Orden	Vibrionales	A2	5.02905974	0.03766692
	Legionellales	A2	2.893406366	0.04604244
	Bacteroidales	DB	2.896622558	0.03276918
	Rhodocyclales	DB	3.532141694	0.04416312
	Lactobacillales	DB	3.508731919	0.02462927
	Rhizobiales	DB	3.923934625	0.00937477
	Sphingomonadales	DB	3.228543165	0.03266344
	Thiotrichales	DB	3.356565325	0.03766692
Familia	Tissierellaceae	A2	3.419531352	0.02824037
	Vibrionaceae	A2	5.111517208	0.04964723
	Legionellaceae	A2	3.303507979	0.04604244
	Rhodocyclaceae	DB	4.057064086	0.04416312
	Enterococcaceae	DB	3.631638641	0.01516294
	Piscirickettsiaceae	DB	3.498533054	0.03766692
	Beijerinckiaceae	DB	3.500732503	0.01107444
Género	Citrobacter	A2	2.671523323	0.04240033
	Tepidimicrobium	A2	2.863745505	0.02824037
	Rubritalea	A2	2.332491826	0.03106086
	Sinorhizobium	DB	2.853527607	0.0325122
	Rubrivivax	DB	2.626398328	0.03783332
	Marivita	DB	2.784557378	0.00557329
	Mycoplana	DB	2.999374774	0.0479175
	Pseudoalteromonas	DB	3.531776548	0.00937477
Especie	Pseudoalteromonas luteoviolacea	DB	2.932900077	0.02064371



DB vs A10				
Nivel taxonómico	Taxonomía	Grupo con mayor abundancia	LDA Score (Log10)	p-value
Orden	Oscillatoriales	A10	2.972024239	0.02421967
	Streptophyta	A10	2.977333885	0.02403452
Familia	o_Streptophyta, f_ND	A10	2.541799771	0.02403452
	Actinomycetaceae	A10	2.645944128	0.01707442
	Criblamydiaceae	A10	2.439935367	0.02953232
	Phormidiaceae	A10	3.065589793	0.02421967
	Bacillaceae	A10	2.765460193	0.04959765
	Ruminococcaceae	A10	2.577083936	0.03180146
Género	Hydrogenophaga	A10	2.580126211	0.04494205
	Novispirillum	A10	2.165340566	0.03106086
	f_Phormidiaceae, g_ND	A10	2.918839487	0.02421967
	Estrella	A10	2.009903655	0.02953232
	Rubritalea	A10	2.061725137	0.01459967
	Stappia	A10	2.015503699	0.02536616
	Bacillus	A10	2.380473918	0.04865737
	Rubrivivax	DB	2.019026674	0.02762903
Especie	g_Actinomyces, s_ND	A10	2.000682508	0.01707442
	g_Bacillus, s_ND	A10	2.395788095	0.04865737
	Stappia meyerae	A10	2.243499248	0.02536616
	g_Novispirillum, s_ND	A10	2.534579938	0.03106086
	g_Rubritalea, s_ND	A10	2.164999118	0.01459967
	g_Beijerinckia, s_ND	A10	2.234347654	0.00907218
	f_Phormidiaceae, s_ND	A10	2.919449576	0.02421967
	Estrella lausannensis	A10	2.108967659	0.02953232
	g_Hydrogenophaga, s_ND	A10	2.585550126	0.04494205
	o_Streptophyta, s_ND	A10	2.026856608	0.02403452
	f_Alteromonadaceae, s_ND	A10	2.053669619	0.02540908
	g_Rubrivivax, s_ND	DB	2.051355573	0.02762903

**Anexo 5.3 Especies diferencialmente abundantes de acuerdo al análisis de LEfSe de los diferentes grupos: Arriba) Hepatopáncreas A2 vs A10. Abajo) Intestinos A2 vs A10**

Hepatopáncreas - A2 vs A10				
Nivel taxonómico	Taxonomía	Grupo con mayor abundancia	LDA Score (Log10)	p-value
Fila	Cyanobacteria	A2	4.710822394	0.005613231
	Bacteroidetes	A10	4.696695405	0.000878623
	Firmicutes	A10	4.468743326	0.009740122
	Fusobacteria	A10	4.81074231	0.003134851
Clase	Actinobacteria	A2	4.274045897	0.042254021
	Bacteroidia	A2	3.864373176	0.001841808
	Chloroplast	A2	3.937593345	0.005613231
	ML635J 21	A2	4.605195545	0.019229449
	Synechococcophycideae	A2	4.59792948	0.013823024
	Bacilli	A10	4.273973551	0.002088939
	Flavobacteriia	A10	4.128286716	0.004438404
	Fusobacteriia	A10	4.828595366	0.003134851
Orden	Actinomycetales	A2	4.300748105	0.042254021
	Bacteroidales	A2	3.559046384	0.001841808
	c_Chloroplast, o_NA	A2	3.726298983	0.02767066
	c_ML635J 21, o_NA	A2	3.99428667	0.019229449
	Pirellulales	A2	4.267115662	0.01934898
	Streptophyta	A2	3.655326185	0.003187708
	Synechococcales	A2	4.604314101	0.013823024
	Aeromonadales	A10	3.982210938	0.001372471
	Bacillales	A10	4.260894325	0.002563517
	c_Betaproteobacteria, o_NA	A10	3.882406957	0.048676672
	Flavobacteriales	A10	3.759819175	0.004438404
	Fusobacteriales	A10	4.795373407	0.003134851
	Lactobacillales	A10	3.543455988	0.000770597
	Oceanospirillales	A10	4.146819489	0.024322916
	Pseudomonadales	A10	4.366539333	0.001106586
Thiotrichales	A10	3.414337079	0.048899849	
Familia	Aeromonadaceae	A10	3.853634632	0.020969353
	c_Chloroplast, f_NA	A2	3.691423373	0.02767066
	c_ML635J 21, f_NA	A2	3.557524166	0.019229449
	Methylobacteriaceae	A2	3.925681797	0.026715698

	Microbacteriaceae	A2	3.522393028	0.01931907
	o_Streptophyta, f_NA	A2	3.427283599	0.003187708
	Paraprevotellaceae	A2	3.631321087	0.01838365
	Pirellulaceae	A2	4.275616982	0.01934898
	Prevotellaceae	A2	3.377821416	0.002285346
	Synechococcaceae	A2	4.587620003	0.013823024
	Alcanivoracaceae	A10	3.982053376	0.004671082
	c_Betaproteobacteria, f_NA	A10	3.425956417	0.048676672
	Exiguobacteraceae	A10	4.139971922	2.25E-05
	Flavobacteriaceae	A10	3.602921314	0.001859687
	Fusobacteriaceae	A10	4.84045447	0.002563517
	Lactobacillaceae	A10	3.179744568	0.000770597
	Moraxellaceae	A10	3.927215076	0.000711741
	Oceanospirillaceae	A10	3.749719747	0.013419731
	Oxalobacteraceae	A10	4.131810014	0.003820067
	Piscirickettsiaceae	A10	3.127239095	0.048899849
	Planococcaceae	A10	3.15689426	4.55E-05
	Pseudomonadaceae	A10	4.086117843	0.004638759
	Weeksellaceae	A10	3.358755599	0.014924956
Género	c_Chloroplast, g_NA	A2	3.22427979	0.003187708
	c_Chloroplast, g_NA	A2	3.126697543	0.02767066
	c_ML635J 21, g_NA	A2	3.112787639	0.019229449
	f_Microbacteriaceae, g_NA	A2	3.397089371	0.042050552
	f_Pirellulaceae, g_NA	A2	4.222981793	0.01934898
	f_Verrucomicrobiaceae, g_NA	A2	2.925546857	0.046347235
	Marivita	A2	2.83838775	0.009953906
	Methylobacterium	A2	3.967901349	0.026715698
	Paulinella	A2	3.225360148	0.024641634
	Prevotella	A2	3.35140092	0.002285346
	Prevotella*	A2	3.003889062	0.01838365
	Prochlorococcus	A2	2.863774597	0.036204238
	Synechococcus	A2	4.520856359	0.011623419
	Acinetobacter	A10	3.555931392	0.003134851
	Alcanivorax	A10	3.445144576	0.004671082
	c_Betaproteobacteria, g_NA	A10	3.195627358	0.048676672
	Cloacibacterium	A10	2.951095064	0.002226925
	Comamonas	A10	2.860723677	0.045793892
	Enhydrobacter	A10	3.625149646	0.000532766

	Exiguobacterium	A10	4.131815749	2.25E-05
	f_Aeromonadaceae, g_NA	A10	3.891122041	0.020969353
	f_Moraxellaceae, g_NA	A10	2.850698839	0.004131344
	f_Oceanospirillaceae, g_NA	A10	3.11075597	0.002226925
	f_Piscirickettsiaceae, g_NA	A10	2.946060133	0.048899849
	Flavobacterium	A10	3.586487529	0.00036503
	Fusobacterium	A10	3.557135733	0.010452721
	Herminiimonas	A10	3.143562904	0.001115968
	Hydrogenophaga	A10	3.005632261	0.011400962
	Janthinobacterium	A10	4.113122265	0.000172092
	Lactobacillus	A10	3.079474969	0.000770597
	Paenibacillus	A10	3.337905451	0.022347982
	Propionigenium	A10	4.706786893	0.003134851
	Pseudomonas	A10	4.110767415	0.008887785
	Psychrilyobacter	A10	3.697267837	0.001678329
	Rummeliibacillus	A10	3.015550106	4.55E-05
	Stappia	A10	3.440326466	0.030885229
Especie	c_Chloroplast, s_NA	A2	2.730384207	0.02767066
	c_ML635J 21, s_NA	A2	2.911410363	0.019229449
	f_Microbacteriaceae, s_NA	A2	3.371438931	0.042050552
	f_Pirellulaceae, s_NA	A2	4.262934018	0.01934898
	f_Verrucomicrobiaceae, s_NA	A2	2.619413348	0.046347235
	g_Marivita, s_NA	A2	2.77522022	0.009953906
	g_Methylobacterium, s_NA	A2	4.056625843	0.026715698
	g_Paulinella, s_NA	A2	3.221038063	0.024641634
	g_Prevotella, s_NA	A2	2.713013216	0.01838365
	g_Prochlorococcus, s_NA	A2	2.781471625	0.036204238
	g_Synechococcus, s_NA	A2	4.525034182	0.011623419
	o_Streptophyta, s_NA	A2	3.195555207	0.003187708
	Prevotella copri	A2	3.271419925	0.002285346
	Acinetobacter guillouiae	A10	2.92257147	0.002226925
	Acinetobacter johnsonii	A10	3.055598444	0.004638759
	c_Betaproteobacteria, s_NA	A10	2.767153818	0.048676672
	Enhydrobacter aerosaccus	A10	2.618251326	0.007900574
	f_Moraxellaceae, s_NA	A10	2.545664898	0.004131344
	f_Aeromonadaceae, s_NA	A10	3.884043242	0.020969353
	f_Oceanospirillaceae, s_NA	A10	2.804310842	0.002226925
	f_Piscirickettsiaceae, s_NA	A10	2.877356482	0.048899849

	Flavobacterium succinicans	A10	2.88356987	0.000513615	
	g_Acinetobacter, s_NA	A10	3.35000329	0.006714283	
	g_Alcanivorax, s_NA	A10	2.960601241	0.004671082	
	g_Cloacibacterium, s_NA	A10	2.940337945	0.002226925	
	g_Comamonas, s_NA	A10	2.187547751	0.045793892	
	g_Enhydrobacter, s_NA	A10	3.632939847	0.000532766	
	g_Exiguobacterium, s_NA	A10	4.16999991	2.25E-05	
	g_Flavobacterium, s_NA	A10	3.518632114	0.00036503	
	g_Fusobacterium, s_NA	A10	3.552706978	0.010452721	
	g_Herminiimonas, s_NA	A10	3.137207131	0.001115968	
	g_Hydrogenophaga, s_NA	A10	2.782741511	0.011400962	
	g_Lactobacillus, s_NA	A10	3.084185631	0.000770597	
	g_Paenibacillus, s_NA	A10	2.863383487	0.022347982	
	g_Propionigenium, s_NA	A10	4.698280709	0.003134851	
	g_Pseudoalteromonas, s_NA	A10	2.648613056	0.02656578	
	g_Pseudomonas, s_NA	A10	4.070338339	0.010625504	
	g_Psychrilyobacter, s_NA	A10	3.68743754	0.001678329	
	g_Rummeliibacillus, s_NA	A10	3.018005762	4.55E-05	
	Janthinobacterium lividum	A10	4.128599702	0.000172092	
	Pseudoalteromonas luteoviolacea	A10	2.59584997	0.006027692	
	Pseudomonas veronii	A10	3.037005639	0.00649879	
	Staphylococcus aureus	A10	2.908936302	0.025636508	
	Stappia meyerae	A10	2.987519527	0.030885229	
<b>Intestinos - A2 vs A10</b>					
	<b>Nivel taxonómico</b>	<b>Taxonomía</b>	<b>Grupo con mayor abundancia</b>	<b>LDA Score (Log10)</b>	
				<b>p-value</b>	
Fila		Armatimonadetes	A10	2.146128909	0.012748572
		Chloroflexi	A10	2.71504617	0.002213692
		Cyanobacteria	A10	4.413711283	0.04964723
		Euryarchaeota	A10	2.867396711	0.007643288
		OP1	A10	2.23313867	0.031909312
Clase		0319_6E2	A10	3.067341006	0.012748572
		Acidimicrobia	A10	3.206885403	0.028240369
		Alphaproteobacteria	A10	4.341520707	0.024343384
		Anaerolineae	A10	2.860889076	0.014117006
		Bacilli	A10	3.332541778	0.024343384
		Chloroplast	A10	4.125731727	0.028240369
		Ellin6529	A10	2.673321778	0.015040021

	Flavobacteriia	A10	2.775265468	0.037666922
	Halobacteria	A10	2.999605478	0.007643288
	ML635J 21	A10	2.773520261	0.037666922
	MSBL6	A10	2.80053332	0.031909312
	Oscillatoriophyceae	A10	3.132817038	0.015291593
	Synechococcophycideae	A10	4.10265985	0.043308143
Orden	Acidimicrobiales	A10	3.1743165	0.028240369
	Aeromonadales	A10	2.866872791	0.028240369
	Bacillales	A10	3.346439013	0.043308143
	c_0319 6E2, o_NA	A10	3.182745378	0.012748572
	c_Anaerolineae, S0208	A10	2.839563393	0.004491633
	c_Ellin6529, o_NA	A10	2.933902041	0.015040021
	c_ML635J 21, o_NA	A10	2.809285295	0.037666922
	c_MSBL6, o_NA	A10	3.049909627	0.031909312
	c_Nostocophycideae, o_NA	A10	2.911686602	0.04964723
	Chroococcales	A10	2.889475333	0.02421967
	Desulfobacterales	A10	2.804488764	0.037666922
	Flavobacteriales	A10	2.824150619	0.037666922
	Halobacteriales	A10	2.921639797	0.007643288
	Haloplasmatales	A10	2.886976153	0.01077169
	Lactobacillales	A10	3.087397873	0.000889657
	o_Alteromonadales	A10	3.308864188	0.006656727
	Oscillatoriales	A10	3.026773804	0.037500712
	Rhizobiales	A10	3.863706872	0.028240369
	Stramenopiles	A10	3.787697737	0.04964723
Thiotrichales	A10	2.941984118	0.020921335	
Familia	Alcaligenaceae	A10	3.131547518	0.014731688
	Alteromonadaceae	A10	2.83864856	0.020921335
	Bacillaceae	A10	2.919511688	0.017926339
	o_Bacillales, f_NA	A10	2.714689589	0.022632101
	c_0319 6E2, f_NA	A10	2.782300497	0.012748572
	c_Ellin6529, f_NA	A10	2.604910706	0.015040021
	c_ML635J 21, f_NA	A10	2.548895339	0.037666922
	c_MSBL6, f_NA	A10	2.921057159	0.031909312
	c_Nostocophycideae, f_NA	A10	2.754492451	0.04964723
	Cyanobacteriaceae	A10	2.635752833	0.042400326
	Desulfobulbaceae	A10	2.595478341	0.024034519
	Enterococcaceae	A10	2.726988375	0.002044131

	f_C111	A10	3.092736464	0.015313822
	Flavobacteriaceae	A10	2.651300966	0.012963597
	Gomphosphaeriaceae	A10	2.530981922	0.034692915
	Halobacteriaceae	A10	2.838062895	0.007643288
	Haloplasmataceae	A10	2.600370992	0.01077169
	o_Chromatiales, f_NA	A10	2.687884335	0.01304252
	o_S0208, f_NA	A10	2.63509346	0.004491633
	o_Stramenopiles, f_NA	A10	3.688381644	0.04964723
	Phormidiaceae	A10	2.991656162	0.037500712
	Phyllobacteriaceae	A10	3.466677242	0.028240369
	Piscirickettsiaceae	A10	2.69702959	0.020921335
	Alteromonas	A10	2.174273143	0.009923378
	Bacillus	A10	2.505954528	0.037625352
	c_0319 6E2, g_NA	A10	2.048047575	0.012748572
	c_Anaerolineae, g_NA	A10	2.48946472	0.004491633
	c_Ellin6529, g_NA	A10	2.228660089	0.015040021
	c_Gammaproteobacteria, g_NA	A10	2.179332855	0.01304252
	c_ML635J 21, g_NA	A10	2.422289467	0.037666922
	c_MSBL6, g_NA	A10	2.384397522	0.031909312
	c_Nostocophycideae, g_NA	A10	2.742552206	0.04964723
	Clostridiisalibacter	A10	2.307661512	0.04551651
	Cyanobacterium	A10	2.189980571	0.014014009
	Enterococcus	A10	2.155788248	0.002044131
	f_Bacillaceae, g_NA	A10	2.373925618	0.020367513
Género	f_C111, g_NA	A10	3.125416349	0.015313822
	f_Desulfobulbaceae, g_NA	A10	2.416245353	0.024034519
	f_Gomphosphaeriaceae, g_NA	A10	2.392124401	0.034692915
	f_Haloplasmataceae, g_NA	A10	2.033112556	0.011830551
	f_Oceanospirillaceae, g_NA	A10	2.486401653	0.032869234
	f_Phormidiaceae, g_NA	A10	2.991094368	0.037500712
	f_Phyllobacteriaceae, g_NA	A10	3.324107552	0.028240369
	f_Piscirickettsiaceae, g_NA	A10	2.479144041	0.020921335
	Flavobacterium	A10	2.054978859	0.005207537
	Halogranum	A10	2.351093687	0.00744468
	Haloplasma	A10	2.434280063	0.017686769
	Halorussus	A10	2.488042791	0.005328246
	Haloterrigena	A10	2.250562363	0.020733177
	Microbulbifer	A10	2.492910644	0.044729535

	Nautella	A10	2.117026049	0.028220832
	Nitratireductor	A10	2.930082961	0.042400326
	o_Stramenopiles, g_NA	A10	3.735299636	0.04964723
	Paulinella	A10	2.741031738	0.04964723
	planctomycete	A10	3.049967298	0.019346974
	Pontibacillus	A10	2.468542507	0.048657375
	Prochlorococcus	A10	2.284125429	0.049448959
	Roseibium	A10	2.242606111	0.028240369
	Roseivivax	A10	2.145151234	0.031347175
	Ruegeria	A10	2.357266055	0.036837803
Especie	c_0319 6E2, s_NA	A10	2.168680405	0.012748572
	c_Ellin6529, s_NA	A10	2.27254728	0.015040021
	c_ML635J 21, s_NA	A10	2.455656728	0.037666922
	c_MSBL6, s_NA	A10	2.347173755	0.031909312
	c_Nostocophycideae, s_NA	A10	2.743459237	0.04964723
	f_Bacillaceae, s_NA	A10	2.345875472	0.020367513
	f_C111, s_NA	A10	3.10801123	0.015313822
	f_Desulfobulbaceae, s_NA	A10	2.374391411	0.024034519
	f_Gomphosphaeriaceae, s_NA	A10	2.442152037	0.034692915
	f_Haloplasmataceae, s_NA	A10	2.135730817	0.011830551
	f_Oceanospirillaceae, s_NA	A10	2.654858736	0.032869234
	f_Phormidiaceae, s_NA	A10	2.916050378	0.037500712
	f_Phylobacteriaceae, s_NA	A10	3.352787302	0.028240369
	f_Piscirickettsiaceae, s_NA	A10	2.518341917	0.020921335
	g_Achromobacter, s_NA	A10	2.243686338	0.014731688
	g_Alteromonas, s_NA	A10	2.457402146	0.009923378
	g_Bacillus, s_NA	A10	2.486460253	0.037625352
	g_Clostridiisalibacter, s_NA	A10	2.315618588	0.04551651
	g_Cyanobacterium, s_NA	A10	2.315212722	0.014014009
	g_Enterococcus, s_NA	A10	2.023358984	0.002044131
	g_Flavobacterium, s_NA	A10	2.186609995	0.005207537
	g_Halogranum, s_NA	A10	2.319808062	0.00744468
	g_Haloterrigena, s_NA	A10	2.296618026	0.020733177
	g_Nitratireductor, s_NA	A10	2.963944273	0.042400326
	g_Paulinella, s_NA	A10	2.707733958	0.04964723
	g_Pontibacillus, s_NA	A10	2.4610433	0.048657375
	g_Prochlorococcus, s_NA	A10	2.24722693	0.049448959
	g_Pseudoalteromonas, s_NA	A10	3.038655121	0.037666922



g_Roseivivax, s_NA	A10	2.176949867	0.031347175
g_Ruegeria, s_NA	A10	2.38117766	0.036837803
g_Staphylococcus, s_NA	A10	3.116192086	0.024629267
Haloplasma contractile	A10	2.421799148	0.017686769
Halorussus rarus	A10	2.493108379	0.005328246
Nautella italica	A10	2.192937346	0.028220832
o_Bacillales, s_NA	A10	2.040280931	0.022632101
o_Chromatiales, s_NA	A10	2.390638019	0.01304252
o_S0208, s_NA	A10	2.52063335	0.004491633
o_Stramenopiles, s_NA	A10	3.6977286	0.04964723
planctomycete MS30D1	A10	3.034208487	0.019346974
Pseudoalteromonas luteoviolacea	A10	2.645402087	0.013022769
Roseibium denhamense	A10	2.309727793	0.028240369

**Anexo 6. Especies probióticas y su presencia, tanto en Silva132 como en *Green genes* 13.8, así como aquellas especies que se logran asignar en cada una de las bases de datos.**

(La marca “\*” indica que esa especie sí se encuentra. La marca “-“, indica que está ausente)

Especie	Presente en Silva132	Asignados usando Silva132	Presente en Green genes 13.8	Asignado usando Green genes 13.8
<i>Aeromonas bivalvium</i>	-	-	-	-
<i>Afifella marina</i>	*	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	*	*	-	-
<i>Bacillus aquamaris</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus aryabhatai</i>	*	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	*	*	*	*
<i>Bacillus circulans</i>	*	*	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	*	*	*	-
<i>Bacillus endophyticus</i>	*	-	*	-
<i>Bacillus firmus</i>	*	*	*	*
<i>Bacillus flexus</i>	*	-	*	*
<i>Bacillus foraminis</i>	*	-	*	*
<i>Bacillus jeotgali</i>	*	-	-	*
<i>Bacillus licheniformis</i>	*	*	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	*	*	*	-
<i>Bacillus pumilus</i>	*	*	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	*	*	*	-
<i>Bacillus tequilensis</i>	*	*	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	*	*	*	-
<i>Bacillus vallismortis</i>	*	-	-	-
<i>Bacillus vireti</i>	*	-	-	-
<i>Bacteriovorax</i> DA5	*	-	-	-
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	*	*	*	*
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	*	*	*	-

<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	*	*	-	-
<i>Bowmanella denitrificans</i>	-	-	-	-
<i>Clostridium butyricum</i>	*	*	*	*
<i>Ectothiorhodospira shaposhnikovii</i>	-	-	-	-
<i>Enterobacter hormaechei</i>	*	*	*	*
<i>Enterococcus faecium</i>	*	*	-	-
<i>Enterococcus lactis</i>	*	-	-	-
<i>Exiguobacterium arabatum</i>	-	-	-	-
<i>Glutamicibacter nicotianae</i>	*	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	*	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	*	-	*	-
<i>Lactobacillus casei</i>	*	-	-	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	-	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	*	*	*	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	*	*	-	-
<i>Lactobacillus graminis</i>	*	-	-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	*	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	*	*	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	*	*	*	*
<i>Lactobacillus reuteri</i>	*	*	*	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	*	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	*	*	-	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	*	*	-	-
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	*	-	-	-
<i>Marinomonas communis</i>	*	-	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	*	*	-	-
<i>Pediococcus acidilactici</i>	*	*	*	*
<i>Pediococcus parvulus</i>	-	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	*	-	-	-
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	-	-	*	*
<i>Phaeobacter inhibens</i>	-	-	-	-

<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	*	-	-	-
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	*	*	*	*
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	*	*	*	*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*	*	*	-
<i>Pseudomonas putida</i>	*	*	-	-
<i>Pseudomonas synxantha</i>	*	*	-	-
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	*	-	*	-
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	*	-	*	-
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	*	*	-	-
<i>Shewanella algae</i>	*	-	*	*
<i>Shewanella haliotis</i>	*	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	*	-	*	-
<i>Streptococcus phocae</i>	*	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	*	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	*	*	-	-
<i>Streptomyces californicus</i>	-	-	-	-
<i>Streptomyces fradiae</i>	*	-	-	-
<i>Streptomyces griseus</i>	*	-	-	-
<i>Streptomyces rubrolavendulae</i>	*	-	*	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	*	*	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	*	*	-	-
<i>Vibrio gazogenes</i>	*	-	-	-
<i>Vibrio hepatarius</i>	*	*	-	-
<i>Vibrio mediterranei</i>	*	*	-	-
<i>Weissella confusa</i>	*	-	*	-