



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Efecto del consumo de fructanos en la microbiota de *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones de cultivo comercial”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.A. EGAR AXEL DONJUAN GUERRERO

TUTOR PRINCIPAL

DR. ADRIÁN OCHOA LEYVA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
DR. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Octubre, 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.

El presente proyecto de tesis de maestría se desarrolló en el laboratorio del Dr. Adrián Ochoa Leyva dentro del departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento de CONACYT Ciencia-Frontera-2019-263986 y DGAPA PAPPIT UNAM proyecto IN215520.

El autor de esta tesis recibió la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para estudios de posgrado nivel maestría, con numero de becario 834119.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Blanquita mi madre por aguantarme durante todo este difícil proceso, por tu apoyo incondicional y tu infinito amor. A Cesar mi hermano por siempre estar a mi lado.

Al Dr. Adrián Ochoa Leyva por abrirme las puertas de su laboratorio, introducirme al fascinante mundo de la bioinformática, por su guía durante la realización del proyecto, por mostrarme su pasión en la investigación y por su paciencia.

A los doctores Agustín López Munguía y Enrique Merino por sus observaciones y orientación en los tutorales.

A los miembros del jurado por tomarse el tiempo de revisar la presente tesis: Dra. Blanca Taboada, Dr. Adelfo Escalante, Dr. Santiago Castillo, Dr. Lorenzo Segovia y Dr. Armando Hernández.

A la M. en C. María Elena Rodríguez por su apoyo no solo en lo académico en el análisis cromatográfico de la tesis sino también por su apoyo a nivel personal.

A mis amigos del Lab-22 Microbiomics gracias por los momentos compartidos. Agradezco a la M. en C. Fernanda Cornejo, al Biol. Filiberto Sánchez que colaboraron con su apoyo técnico para la realización de este trabajo y al Dr. Rodrigo García López por su orientación en el proceso bioinformático.

A mis compañero de generación y especialmente a mis amigos del equipo de Palomas Tikas por hacer de mi estancia en el instituto increíble cada palapazo, miércoles de partido, cada reunión en los depas azules :v.

Gracias Emma Arévalo y Jorge Jiménez por su pokeamistad.

RESUMEN

La demanda de consumo del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) aumenta año con año a nivel mundial. Uno de los principales problemas que enfrenta el cultivo de camarón es el brote de enfermedades que pueden llegar a mermar incluso la producción total de *L.vannamei*. Esto ha llevado al desarrollo de prácticas que permitan maximizar el rendimiento de la producción.

El presente trabajo evalúa el uso de prebióticos de tipo fructano (inulina y agavina) suplementados al 2% en el cultivo tanto en el rendimiento del cultivo, como de la comunidad microbiana del hepatopáncreas y del intestino de este crustáceo.

Se contó con 5 grupos experimentales con 22 camarones cada uno, se probaron 5 dietas diferentes (agavina16, agavina17, inulina, control y alimento comercial usado en la granja). Para la caracterización de la microbiota del intestino y el hepatopáncreas se secuenció la región hipervariable V3-V4 del gen ribosomal 16s rRNA.

Se encontró que el uso de estos fructanos no influyó en el rendimiento del cultivo del camarón, sin embargo, en el análisis bioinformático reveló que el uso de prebióticos impacta la composición de la microbiota dependiendo del órgano, siendo la microbiota del hepatopáncreas la que se vio modificada por el uso de estos en la dieta del camarón. La inulina fue el fructano que probó tener un mejor desempeño modulando la microbiota en el hepatopáncreas disminuyendo la abundancia de bacterias del género *Photobacterium* un patógeno oportunista en el camarón y aumentando la abundancia de *Streptococcus* reportada como probiótico en el camarón, todo esto con respecto a la dieta control.

INDICE

INDICE	4
IDICE DE FIGURAS	5
INDICE DE TABLAS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Cultivo de camarón en México.....	10
2.2. Ciclo de vida del camarón.....	12
2.3. Cultivo de camarón.....	14
2.3.1. Ciclo de producción del camarón.....	14
2.3.2. Regímenes de engorda	15
2.4. Microbiota intestinal del camarón blanco del Pacífico	16
2.4.1. Factores que modulan la microbiota en <i>P. vannamei</i>	17
2.5. Enfermedades, problemática en el cultivo de camarón	19
2.6. Prebióticos en el cultivo del camarón blanco del Pacífico	20
2.6.1. Prebióticos.....	20
2.6.2. Fructanos	21
2.6.3. Fructanos en la camaronicultura.....	23
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVOS.....	27
4.1.1. Objetivo General.....	27
4.1.2. Objetivos Específicos	27
5. MATERIALES Y METODOS	28
5.1. Cultivo del camarón	28
5.2. Extracción y cuantificación del ADN genómico.	30
5.2.1. Extracción de ADN del intestino.....	30
5.2.2. Extracción de ADN del hepatopáncreas	30
5.2.3. Cuantificación del ADN extraído	30
5.3. Amplificación de la región V3-V4 del gen ribosomal 16s rRNA	31
5.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	32
5.5. Purificación de los productos de PCR.....	33
5.6. Secuenciación	33
5.7. Análisis bioinformático de las secuencias	33
5.7.1. Limpieza:.....	33
5.7.2. Asignación taxonómica y análisis de diversidad	34
5.7.3. Análisis de diversidad alfa y beta.....	34

5.7.4.	Análisis de abundancia diferencial.....	35
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
6.1.	Análisis químico proximal de las dietas desarrolladas	36
6.2.	Caracterización de los fructanos adicionados a la dieta.....	37
6.2.1.	Cromatografía de exclusión de tamaño (GPC)	38
6.2.2.	Cromatografía de intercambio aniónico acoplado a detector amperométrico.	39
6.2.3.	Estructuras de fructanos propuestas	43
6.3.	Cultivo de camarón.....	44
6.3.1.	Calidad del agua durante el bioensayo	44
6.4.	Evaluación de crecimiento del cultivo de camarón.....	45
6.5.	Análisis bioinformático de la microbiota intestinal y del hepatopáncreas.....	49
6.5.1.	Alfa diversidad.....	50
6.5.2.	Efecto del órgano en la diversidad alfa	51
6.5.3.	Efecto del tratamiento en la diversidad alfa del intestino y el hepatopáncreas	52
6.5.1.	Diversidad beta.....	55
6.5.2.	Taxonomía de la microbiota.....	61
6.6.	Microbiota del hepatopáncreas.....	67
6.6.1.	Abundancias diferenciales entre tratamientos (Lefse).....	75
7.	Perspectivas y limitantes de este trabajo	83
8.	Conclusiones	84
9.	Referencias.....	86
10.	ANEXO	95
10.1.	Formulación alimentos empleados en el bioensayo.	95
10.2.	Cromatografía de exclusión de tamaño.....	96
10.3.	Análisis bioinformático´	97
10.3.1.	Perfil taxonómico del intestino.....	101
10.3.2.	Perfil taxonómico del hepatopáncreas.....	102
10.4.	Diversidad beta	104
10.4.1.	Diversidad beta del intestino	104
10.4.2.	Diversidad beta del hepatopáncreas	106

IDICE DE FIGURAS

Figura 1. Participación porcentual de producción de camarón estatal. CONAPESCA, anuario estadístico 2017.....	11
--	----

Figura 2. Serie histórica nacional de producción de camarón (2008-2018) SIAP.....	12
Figura 3. Ciclo de vida del camarón tomado de Wang, H. et al., 2020.....	13
Figura 4. Ciclo de producción del camarón (FAO, 2009).....	14
Figura 5. Mecanismos de acción de prebióticos. Patrones asociados a microorganismos (PAMPs), Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), profenoloxidasa (proPO), péptidos antimicrobianos (AMPs) modificado de Hasan et al., 2019.....	21
Figura 6. Estructura de fructanos lineales. La sacarosa que sirve como semilla de síntesis está circulada. (a) inulina (b) levana. Fuente: Ritsema & Smeekens, 2003.....	22
Figura 7. Estructura de fructanos ramificadas. La sacarosa que sirve como semilla de síntesis está circulada. Fuente: Ritsema & Smeekens, 2003.....	22
Figura 8. Vista satelital de la grana "El Renacimiento". El estanque en el que se llevó a cabo el bioensayo se señala con su nombre.....	28
Figura 9. Esquema del diseño experimental del bioensayo.....	29
Figura 10. Diagrama de preparación de mezclas de ADN para posteriormente amplificar la región V3-V4.....	31
Figura 11. Ejemplo filtrado de la tabla OTU, cuyos OTU's estuvieran al menos en más del 50% de las muestras por tratamiento. Donde: A1-3 son tres muestras del tratamiento A y B1-3 tres muestras del tratamiento B.....	34
Figura 12. Gráfico de araña del análisis químico proximal de los tratamientos.....	36
Figura 13. HPAEC-PAD de los fructanos. Estándar comercial en rojo, Inulina en verde, Agavina2016 en azul y Agavina2017 en morado.....	39
Figura 14. Comparación de agavinas HPAEC-PAD Estándar comercial en rojo, Agavina2016 en verde, Agavina2017 en azul.....	41
Figura 15. Algunos neofructanos y fructanos de tipo mixto identificados en agavina. Bifurcosa(B), neonistos(4b,4c), neopentosa(5b,5c). Modificado de Mellado-Mojica, González de la Vara, & López, 2017.....	42
Figura 16. Estructura de Agavinas propuesta.....	43
Figura 17. Estructura de inulina propuesta.....	44
Figura 18. Registro de oxígeno disuelto y temperatura durante el bioensayo.....	44
Figura 19. Evaluación del crecimiento del camarón.....	46
Figura 20. Peso final y consumo de alimento.....	48
Figura 21. Curva de rarefacción por muestra.....	50
Figura 22. Efecto del órgano en la diversidad alfa.....	51
Figura 23. Efecto del suplemento con prebiótico en la diversidad alfa en el intestino.....	52

Figura 24. Efecto del suplemento con prebiótico en la diversidad alfa en el hepatopáncreas.	53
Figura 25. Efecto de los tratamientos en la diversidad alfa de la microbiota intestinal.....	54
Figura 26. Efecto de los tratamientos en la diversidad alfa de la microbiota del hepatopáncreas.	55
Figura 27. análisis de coordenadas principales (PCoA) empleando la matriz de distancia UniFrac unweighted.....	56
Figura 28. análisis de coordenadas principales (PCoA) empleando la matriz de distancia UniFrac weighted.....	57
Figura 29. PCoA efecto de los tratamientos en la composición de la microbiota intestinal.	58
Figura 30. PCoA efecto de los tratamientos en la composición de la microbiota del hepatopáncreas.	59
Figura 31. Homogeneidad multivariante de dispersiones de grupos.	60
Figura 32. Abundancia relativa a nivel de phylum por muestra y por tratamiento.	62
Figura 33. Diagrama de Venn a nivel de phylum en el intestino.....	63
Figura 34. Perfil taxonómico de abundancia relativa a nivel de género en el intestino.	65
Figura 35. Diagrama de Venn a nivel de género en el intestino	67
Figura 36. Perfil taxonómico a nivel de phylum en el hepatopáncreas.	68
Figura 37. Diagrama de Venn a nivel de phylum en el hepatopáncreas.....	69
Figura 38. Perfil taxonómico a nivel de género en el hepatopáncreas	72
Figura 39. Diagrama de Venn a nivel de género del hepatopáncreas.....	73
Figura 37. LDA de las bacterias diferenciales en el intestino con respecto al control.	76
Figura 38. LDA comparación entre fructanos en el intestino.	78
Figura 39. LDA de las bacterias diferenciales en el hepatopáncreas con respecto al control.	79
Figura 40. LDA comparación entre las diferentes estructuras fructanos en el hepatopáncreas.....	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades que han afectado la camaronicultura en México (López-Téllez et al., 2019).....	20
Tabla 2. Uso de fructanos como prebiótico en el cultivo de <i>P. vannamei</i>	24
Tabla 3. Tratamientos empleados en el bioensayo.	29

Tabla 4. Componentes de reacción de PCR.	32
Tabla 5. Peso molecular de los fructanos	38
Tabla 6. Caracterización de las moléculas presentes en los fructanos empleados.	40
Tabla 7. Abundancia relativa estimada de las especies identificadas.	42
Tabla 8. Resumen del procesamiento bioinformático: Lecturas antes de la limpieza y secuencias asignadas con QUIIME v1.9.	49
Tabla 8. Cinco phylum más abundantes por tratamiento en el intestino la abundancia relativa promedio se presenta entre paréntesis.	61
Tabla 9. Diez géneros más abundantes por tratamiento en el intestino, la abundancia relativa se presenta entre paréntesis.	64
Tabla 10. Cinco phylum más abundantes en el hepatopáncreas, entre paréntesis se presenta la abundancia relativa.	68
Tabla 11. Diez géneros más abundantes en el hepatopáncreas, entre paréntesis se presenta la abundancia relativa.	71
Tabla 12. Tabla resumen del uso de fructanos en el perfil taxonómico de la microbiota en el intestino y hepatopáncreas.	74

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad ampliamente practicada en todo el mundo y es el sector de producción animal de más rápido crecimiento. De acuerdo con la FAO desde el inicio de los años 80 la producción de camarón cultivado se ha ido incrementado, mientras que la pesca de camarón desde su pico de producción en 1982 se ha ido estancando gradualmente (Flegel et al., 2008).

El cultivo de este crustáceo es un importante recurso económico para México, sin embargo, la presencia de enfermedades es uno de los principales problemas que afecta el cultivo de camarón, ya que pueden ocasionar la pérdida de la producción y por lo tanto pérdida económica. El uso tradicional de antibióticos como estrategia para el control de enfermedades, ha sido criticado debido al posible desarrollo de bacterias resistentes, residuos de antibióticos en los mariscos y supresión del sistema inmune en los animales cultivados (Luna-González et al., 2012; Wahlstr, 2003).

Una estrategia alternativa al uso de antibióticos para el control de enfermedades es a través de la modulación selectiva de la microbiota. En las últimas dos décadas se ha estudiado el papel de la microbiota en la salud y enfermedad, metabolismo, la función del sistema inmune, la nutrición y desarrollo del hospedero (Jin Song et al., 2019).

El objetivo de este trabajo es evaluar el uso de dos prebióticos de tipo fructano principalmente evaluar el uso de agavina como suplemento en la dieta para manipular la microbiota del camarón blanco del Pacífico y favorecer su producción ya que no hay reportes previos de la evaluación de agavina como prebiótico en el cultivo de camarón.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cultivo de camarón en México

En los años 30 comienza la explotación del camarón en México, con la detección de importantes poblaciones en aguas protegidas del Océano Pacífico. Hasta los años 50 predominó como una actividad extractiva por parte de la iniciativa privada y extranjera, destinada a satisfacer el mercado de Estados Unidos. Veinte años después surge el programa de investigación para el cultivo de camarón financiado por diversas instituciones públicas y privadas (Bortolini-Rosales J. & Torres-Garcia M., 2004).

La camaronicultura comienza en México de manera experimental en los años 70 con investigación de la Universidad de Sonora y la Universidad de Arizona en Puerto Peñasco, en la que cultivaron de manera controlada a *Peneaus stylirostris* el camarón azul y *Peneaus californiensis* el camarón café. Hasta 1980 comienza el cultivo comercial de *P. stylirostris* produciendo un total de 4,371 toneladas (Bortolini-Rosales & Torres-Garcia M., 2004; López-Téllez et al., 2019).

El cambio a la producción de *P. stylirostris* a *P. vannamei* (camarón blanco) se da gradualmente a inicios de los años 90. Debido a que los cultivos de camarón azul se vieron afectados por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa la cual era letal para el camarón azul y en cambio el camarón blanco puede tolerar causando deformidad y enanismo en los camarones infectados (López-Téllez et al., 2019).

De acuerdo con datos de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el 2018 se produjeron 230,381 toneladas de camarón. La Figura 1 presenta un gráfico de los principales estados productores y su aporte en porcentaje del total de producción, siendo Sinaloa y Sonora los principales productores a nivel nacional.

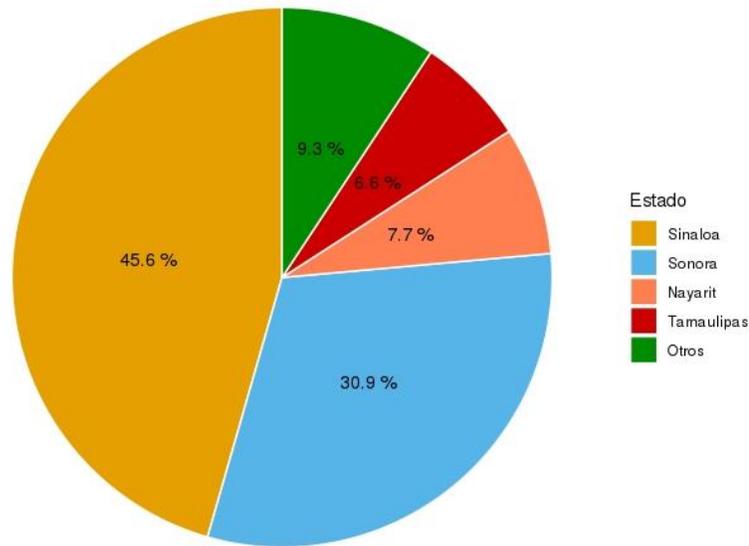


Figura 1. Participación porcentual de producción de camarón estatal. CONAPESCA, anuario estadístico 2017.

La producción de este crustáceo se da bajo la técnica de captura en esteros, bahías y mares, así como mediante acuicultura, en 16 entidades del país. La principal vía por la que se produce camarón en México es mediante la acuicultura. En el territorio nacional, se cuenta con un aproximado de 1,479 granjas dedicadas a la producción y comercialización de este producto. Del total de toneladas producidas en 2018, la camaronicultura contribuye con el 68.59% mientras que la captura aporta el 31.41% de la producción (SAGARPA, 2018).

A continuación, se presenta un histórico de la producción de camarón en México desde el año 2008 hasta el 2018 en el que se observa la tendencia antes mencionada, en la que el pilar principal de la producción de este crustáceo es la acuicultura. Sin embargo, en el año 2013 se observa una caída en la producción por cultivo, esto debido al brote del síndrome de necrosis hepatopancreática aguda (Figura 2).

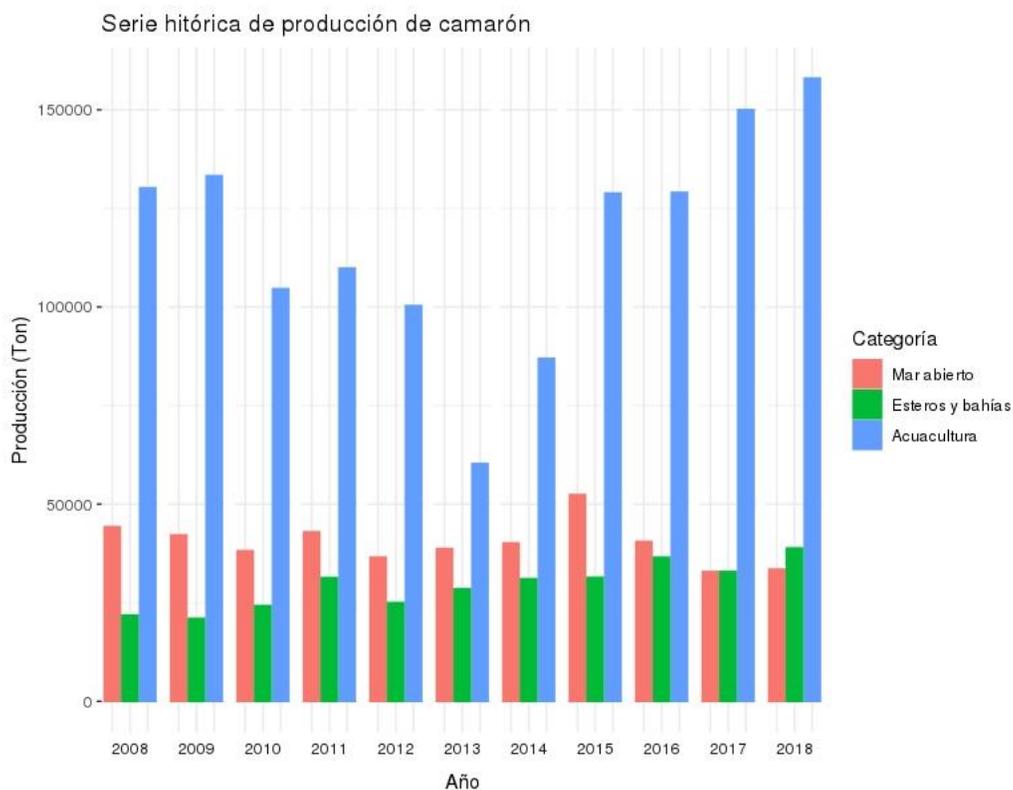


Figura 2. Serie histórica nacional de producción de camarón (2008-2018) SIAP.

Las enfermedades son uno de los principales problemas que afectan a la camaronicultura ya que pueden ocasionar la pérdida total de la producción y por lo tanto una pérdida económica. Mas adelante, en la sección de antecedentes, se retomará este tópico, pero primero se aborda los principales sistemas de cultivo y el ciclo de vida del camarón.

2.2. Ciclo de vida del camarón

La secuencia de desarrollo del camarón se lleva a cabo por etapas larvianas planctónicas. De manera general el primer estadio larval es el Nauplio con cinco subestadios, Protozoa y Mysis con tres subestadios cada uno y finalmente alcanza el estadio post-larva. En la Figura 3 se presenta el ciclo de vida de *L. vannamei* y de *P. monodon*.

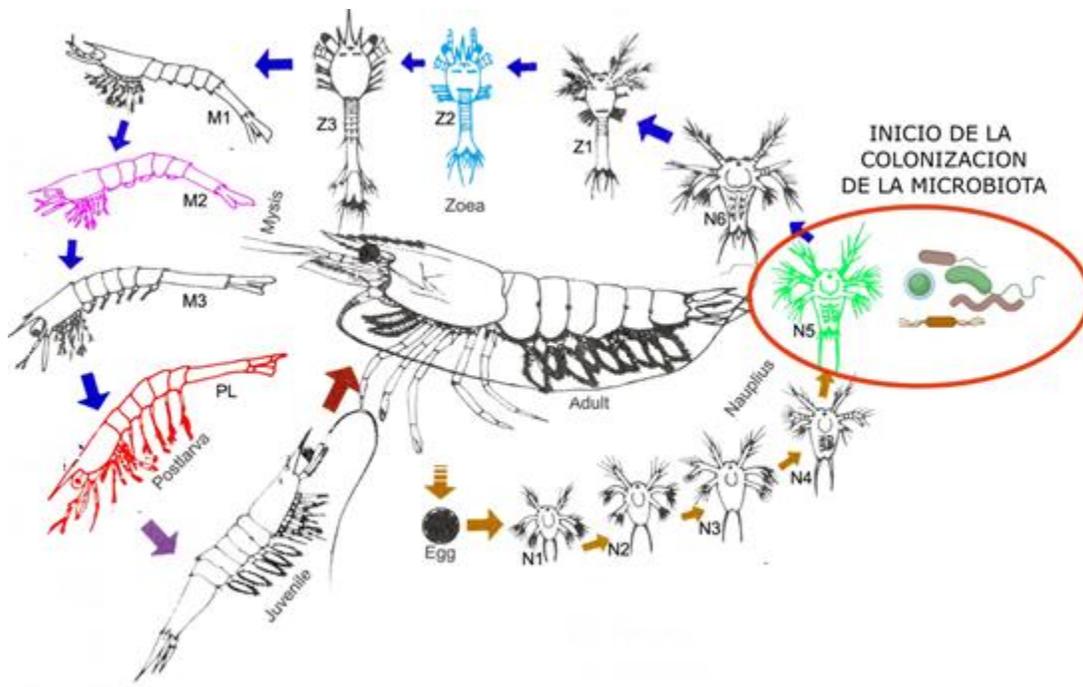


Figura 3. Ciclo de vida del camarón tomado de Wang, H. et al., 2020.

La etapa larval se da en la fase conocida como fase marina del ciclo de vida de camarón. El camarón llega a agua alejadas de la costa para su reproducción, los huevos fecundados eclosionan en un lapso de 10 a 16 h, al eclosionar el huevo entra al estadio de Nauplio en su primer subestadio; en el estadio Naupliar el Nauplio se alimenta de sus reservas y alcanza su ultimo subestadio (Nauplio V) en 24 a 36 h de vida, que es cuando alcanza el primer estadio de Protozoa. El estadio Protozoa posee tres subestadios, en esta etapa ya cuenta con un aparato digestivo completo y es capaz de procurarse alimento para sobrevivir, alimentándose de fitoplancton. La última etapa larval es el estadio de Mysis, durante este estadio, se alimenta de fito y zooplancton. La evolución del ciclo larval se da por mudas sucesivas y culmina cuando alcanza el estadio final de post-larva en un periodo de tiempo de 15-21 días. La fase estuario comienza cuando los post-larva migran a los estuarios, lagunas costeras y manglares. Los post-larva se transforman en juveniles y permanecen en los estuarios por un lapso de 3-4 meses. Finalmente migran al mar abierto y repiten el ciclo. Un camarón vive de 1-2 años (Fenucci J., 1988).

2.3. Cultivo de camarón

La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, FAO, por sus siglas en inglés, define la acuicultura como “cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción.” En México, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) define a la acuicultura como “el conjunto de actividades dirigidas a la reproducción controlada, pre-engorda y engorda de especies de fauna y flora marina realizadas en instalaciones de agua dulce, marina o salobre, por medio de técnicas de cría o cultivo que sean susceptibles de explotación comercial, ornamental o recreativa”.

2.3.1. Ciclo de producción del camarón

La siguiente Figura 4 esquematiza el ciclo de producción de *Peneaus vannamei*.

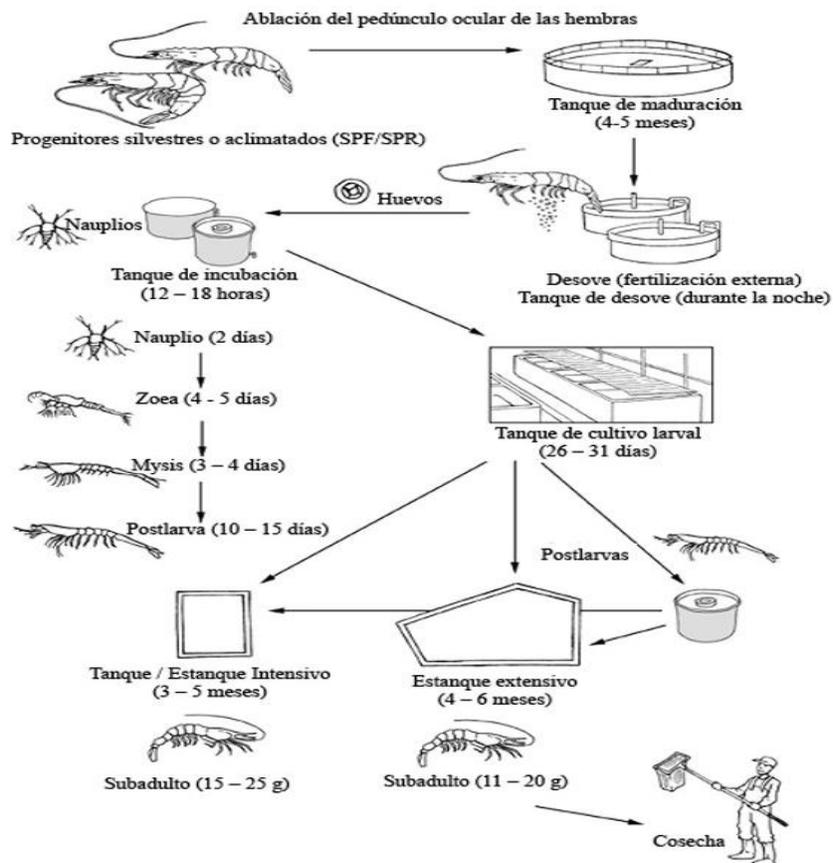


Figura 4. Ciclo de producción del camarón (FAO, 2009).

El cultivo de camarón tiene las siguientes etapas:

- a. **Selección de las larvas:** Las larvas pueden provenir de tres diferentes orígenes. I) Silvestres, es decir, capturados en el mar. II) De las cosechas de camarón cultivado en estanques. III) Semillas de laboratorio, reproductores libres de patógenos específicos (SPF) o resistentes a patógenos específicos (SPR).
- b. **Maduración y reproducción:** La maduración es el proceso por el cual los machos y las hembras desarrollan sus órganos genitales. Las hembras se reproducen a una edad entre 8 y 10 meses mientras que los machos alcanzan su mayor capacidad reproductiva a los 10 meses.
- c. **Desove:** *P. vanammei* en el desove produce alrededor de 70 000 – 100 000 huevos por camarón de los cuales aproximadamente el 50% son viables. Las hembras desovan en tanques comunales o individuales. Los huevos se incuban durante 12-18 h.
- d. **Cultivo larval:** El cultivo de nauplio se da en tanques denominados de cultivo larval y se da el desarrollo del camarón pasando por todos sus estadios larvales (Nauplius, Protozoa, Mysis, Postlarva) hasta postlarva, en un proceso que lleva de 10-15 días.
- e. **Engorda:** La engorda consiste en la alimentación del camarón hasta alcanzar la talla requerida para su comercialización, finalmente se da la cosecha del producto. Existen 4 tipos de sistemas de engorda los cuales se describen a continuación.

2.3.2. Regímenes de engorda

Los regímenes de engorda se clasifican de la siguiente manera:

- a) **Extensivo:** es de baja inversión, los estanques se alimentan con una densidad de 2-10 camarones/m². La población se mantiene con bajos recambios de agua, buena concentración de fitoplancton sin la necesidad de

uso de alimento artificial. Llega a producir en 4-5 meses un rendimiento de 150-500 kg/ha/cosecha.

- b) **Semi-intensivo:** utiliza semillas producidas en incubadoras y se alimenta a los estanques con una densidad de entre 10-30 camarones/m². Se bombea agua para su recambio el camarón se alimenta de productos presentes en el estanque y se complementa con alimento artificial 2-3 veces por día. Este tipo de engorda genera 2 000 kg/ha/cosecha, con dos cosechas por año.
- c) **Intensivo:** es un sistema de cultivo de alta densidad, los estanques en este sistema se alimentan con una densidad de entre 60 – 300 camarones/m², la alimentación en este sistema se da con alimentos artificiales suministrados de 4-5 veces al día. Se pueden lograr de 2 a 3 cosechas por año con un rendimiento de 35 – 30 000 kg/ha/cosecha.

La principal diferencia que se puede destacar es que el nivel de inversión y el nivel tecnológico requerido, el cual aumenta de la siguiente manera extensivo>semi-intensivo>intensivo. De igual manera aumenta la densidad de siembra en los estanques y el rendimiento en la cosecha.

2.4. Microbiota intestinal del camarón blanco del Pacífico

La microbiota juega un papel importante en la salud del hospedero previniendo el crecimiento de bacterias patógenas y modulando la respuesta inmune, ayuda en la absorción de nutrientes y regulación metabólica (Cornejo-Granados et al., 2018). En el caso específico del camarón, la colonización bacteriana del tracto gastrointestinal se da en la etapa de desarrollo Nauplio 5 cuando el camarón tiene 24 a 36 h de nacido; cuando el poro anal comienza los movimientos antiperistálticos conocido como “anal drinking” de deglución para introducir agua al canal de alimentación, antes que la boca se abra (Figura 3) (E. Li et al., 2018).

Las investigaciones para develar la microbiota intestinal de *P. vannamei* han tenido dos diferentes acercamientos: métodos de cultivo clásicos y métodos independientes de cultivo, como son la electroforesis en gel en gradiente desnaturizante (DGGE) y recientemente dado el interés comercial del camarón y

el abaratamiento de las tecnologías de secuenciación masiva, la secuenciación masiva del gen ribosomal 16s rRNA (Cornejo-Granados et al., 2018).

E. Li et al. en 2018 describe que la microbiota de *P. vanammei* los *phylum* más dominantes son: Proteobacteria seguida de *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* sin embargo la abundancia relativa de estas dependerá de factores como el ambiente y la dieta.

En nuestro grupo de investigación en el 2017 se realizó la caracterización de la microbiota intestinal de *P. vannamei* comparando las diferencias entre camarón cultivado sano, camarón cultivado enfermo y camarón de mar abierto. La microbiota del intestino se encontró que los *phylum* más abundantes en la mayoría de las muestras eran *Proteobacteria* y *Cyanobacteria*, mientras que a nivel de familia las más abundantes eran *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae*. A nivel de género los más abundantes fueron *Vibrio*, *Photobacterium* y *Paracoccus*. En contraste los *phylum* más abundantes únicos del camarón de mar abierto fueron *Nitrospirae* y *Actinobacteria* mientras que para el camarón cultivado fueron *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Fusobacteria* (Cornejo-Granados et al., 2017). Posteriormente en 2018 se realizó un meta-análisis en el que se estudió la microbiota intestinal de 199 muestras de camarón siendo *P. vannamei* la más estudiada, encontrando que los principales factores que afectan la microbiota son: el estilo de vida (camarón es de vida libre, de granja o de laboratorio), el órgano, el estado de desarrollo y la dieta (Cornejo-Granados et al., 2018).

2.4.1. Factores que modulan la microbiota en *P. vannamei*

- **Medio ambiente y estilo de vida del camarón:**

Se han realizado diferentes estudios para conocer la relación que guarda la microbiota intestinal con el medio ambiente (Cornejo-Granados et al., 2017; Fan et al., 2019; D Hou, 2018). Encontrando que la microbiota intestinal guarda una fuerte relación con los sedimentos, siendo la diversidad bacteriana mayor en los sedimentos que en el agua y que la composición de la microbiota es similar a nivel

de *phylum* en los intestinos, el agua y los sedimentos pero a nivel de familia o género la abundancia y la composición es diferente.

En cuanto el estilo de vida se ha encontrado una diferencia en la diversidad y composición de la microbiota dependiendo si el camarón es de vida libre, criado en granja o en laboratorio. Encontrando que por ejemplo el género *Enterobacter*, y *Caldilinea* se encuentran diferencialmente abundantes con respecto a los camarones de vida libre o criados en laboratorio (Cornejo-Granados et al., 2018) siendo el estilo de vida/ medio ambiente el principal modulador de la microbiota, es decir, si el camarón se desarrolló en el mar o en estanque.

- **Organo:**

Si bien la microbiota del intestino ha sido la más estudiada, órganos como el hepatopáncreas también han sido investigados. Cornejo-Granados et al., 2018 en un meta-análisis encontraron que el intestino posee una mayor diversidad filogenética que el hepatopancreas. Bacterias del género *Acinetobacter* y *Pseudomonas* se encontraron diferencialmente abundantes en el hepatopáncreas, mientras que en el intestino bacterias del género *Lactococcus* y *Shewanella*.

Cornejo-Granados et al., 2017, describe la microbiota del hepatopancreas en camarones cultivados en granja, siendo *Protobacteria* como el *phylum* más abundante, *Vibrionaceae* y *Moraxellaceae* como las familia más abundante y a nivel de género las más abundantes fueron *Pseudomonas* (18%), *Vibrio* (3%) y *Escherichia* (3%). En un análisis meta-transcriptómico del hepatopáncreas se encontró, que los *phylum* de bacterias más representados fueron *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Valle-gough et al., 2018).

Finalmente Guzmán-Villanueva et al., 2020, analizaron la microbiota del hepatopáncreas empleando la región V3 del gen 16s rRNA para la caracterización de la microbiota del hepatopáncreas, encontrando que a nivel de *phylum* este órgano se ve dominado por *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Planctomycetes*.

- **Dieta:**

Se ha estudiado el efecto de diferentes fuentes de lípidos en la dieta y como estos afectan la microbiota del camarón blanco del Pacífico (M. Zhang et al., 2014). En este estudio prueban: aceite de soya, sebo de res, aceite de linaza y aceite de pescado. Observaron que la familia *Bacteroidaceae* se encontraba presente solo en las muestras tratadas con aceite de soya en una abundancia relativa de 0.01-0.08%, mientras que la familia *Rhizobacteriaceae* tuvo una mayor prevalencia en el grupo alimentado con aceite de linaza. Analizando estas mismas muestras, Cornejo-Granados et al., 2018, encontraron enriquecimiento de *Shewanella* en las muestras alimentadas con sebo de res y a *Agrobacterium* en la dieta de aceite de linaza.

También se han probado dietas con diferentes fuentes de carbohidratos: glucosa, sacarosa y almidón de maíz (Qiao et al., 2017). Los resultados mostraron que en el grupo alimentado con almidón de maíz disminuyeron su abundancia los *phylum Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, mientras que aumentó la abundancia de *Firmicutes*.

2.5. Enfermedades, problemática en el cultivo de camarón

El cultivo de camarón a gran escala proporciona condiciones casi ideales para la aparición y propagación de enfermedades ya que los animales se encuentran en tanques con altas densidades de población. Asimismo el intercambio de agua suele ser limitado y los animales moribundos no son retirados del sistema, aunado a una práctica común en camarones como es el canibalismo, genera que se diseminen patógenos de manera efectiva (Cock et al., 2009).

Las enfermedades durante el cultivo de camarón han representado pérdidas económicas graves y han impedido el desarrollo sostenible de esta actividad alrededor del mundo (J. Zhang et al., 2012). Del 100% de pérdidas por enfermedad de camarón cultivado, un 60% se debe a pérdida por enfermedad viral, un 20% a bacterias, seguido de hongos con el 7%, parásitos 5% y el resto por causas desconocidas (Flegel et al., 2008).

México no es la excepción, las enfermedades que han afectado su producción se resumen en la Tabla 1 (López-Téllez et al., 2019).

Tabla 1. Enfermedades que han afectado la camaronicultura en México (López-Téllez et al., 2019).

Origen de la enfermedad	Enfermedad	Año	Pérdida económica estimada en dólares con respecto al año anterior
Viral	Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa	1987, 2009, 2011	2009: sin pérdida económica 2011: sin pérdida económica
Viral	Virus del síndrome de Taura	1995, 2003, 2007	1995: -\$34,752,492.52 2003: sin pérdida económica 2007: -\$15,362,428.38
Viral	Virus del síndrome de la mancha blanca	1999, 2005, 2010 y 2012	1999: -\$31,944,036.57 2005: sin pérdida económica 2010: -\$98,702,910.72 2012: -\$117,428,598.20
Bacteriana	Necrosis hepatopancreática aguda	2013	-\$200,632,180.25

2.6. Prebióticos en el cultivo del camarón blanco del Pacífico

2.6.1. Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles (por el hospedero) que aportan un beneficio para el consumidor (Gibson & Roberfroid, 1995). Dichos beneficios incluyen estimular la respuesta inmunológica, promover el crecimiento del hospedero, aumento del área de absorción intestinal y resistencia favorecen la proliferación y/o la actividad de bacterias benéficas dentro de la microbiota intestinal (González-Félix et al., 2018; J. Zhang et al., 2012). Se han propuesto dos mecanismos por los cuales los prebióticos actúan en el hospedero (Figura 5):

- a) Fermentación del prebiótico por la microbiota intestinal: efectúan cambios en la microbiota del hospedero evitando la invasión de microorganismos patógenos, cambio de pH en el intestino debido a la producción de ácidos orgánicos consecuencia de la fermentación del prebiótico por la microbiota intestinal, favorecen la formación de mucosidad en las células epiteliales del intestino.

b) Estimulación del sistema inmune innato: Esta respuesta se debe a que la estructura de los prebióticos es parecida a compuestos presentes en la pared celular de los microorganismos e interactúan con receptores de reconocimiento de patrones en forma de patrones asociados a microorganismos como el peptidoglucano, el ácido teicoico entre otros.

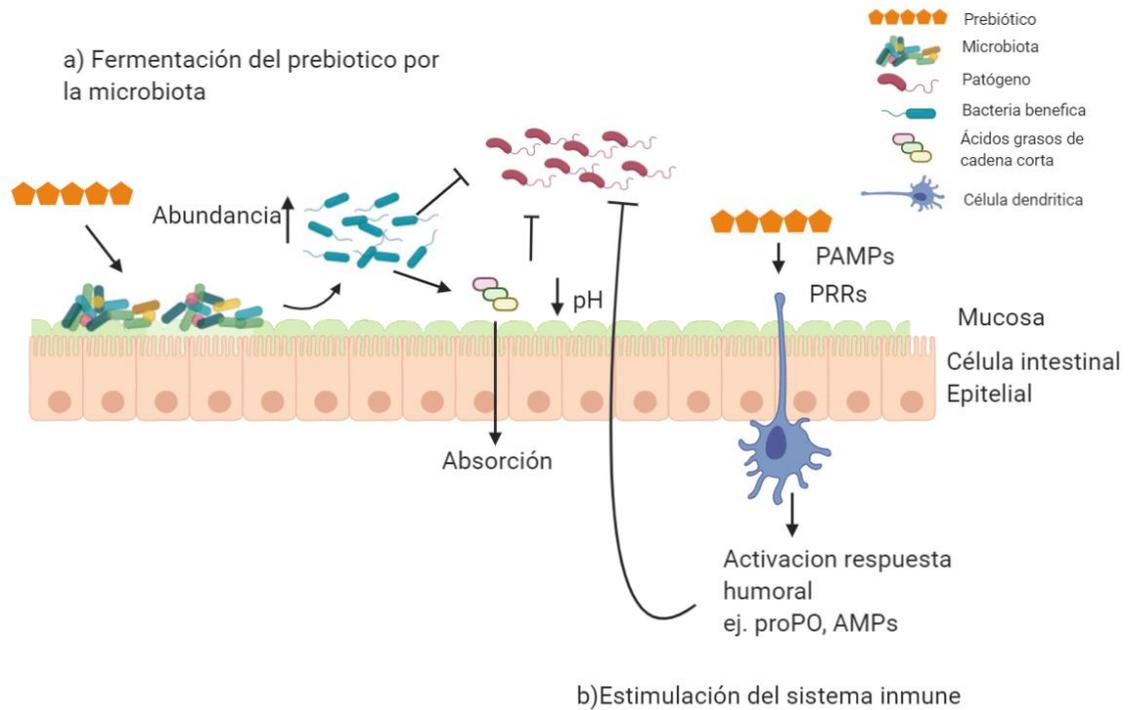


Figura 5. Mecanismos de acción de prebióticos. Patrones asociados a microorganismos (PAMPs), Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), profenoloxidasa (proPO), péptidos antimicrobianos (AMPs) modificado de Hasan et al., 2019.

2.6.2. Fructanos

Dentro de los compuestos conocidos típicamente como prebióticos se encuentran los fructanos. Estos compuestos son polímeros de fructosa sintetizados a partir de la fructosa de una molécula de sacarosa en plantas, son usados como carbohidratos de reserva y funcionan como agentes contra la desecación y el estrés por frío (Ritsema & Smeekens, 2003). Se clasifican como inulinas si presentan enlace glucosídico β -2,1 y levanas cuando la fructosa se une mediante enlaces tipo β -2,6; estas dos categorías previas se caracterizan por ser polímeros de fructosa lineales, sus estructuras se presentan en la Figura 6.

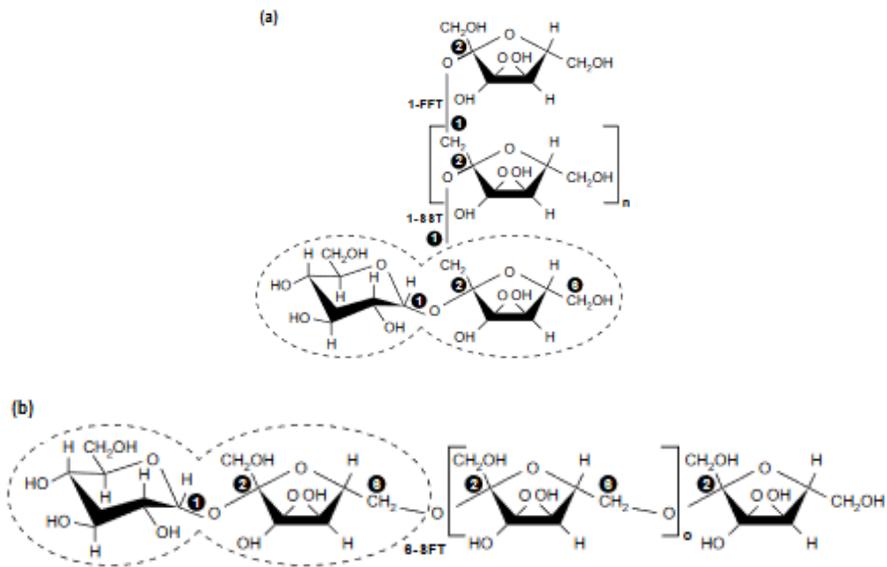


Figura 6. Estructura de fructanos lineales. La sacarosa que sirve como semilla de síntesis está circulada. (a) inulina (b) levana. Fuente: Ritsema & Smeekens, 2003

Finalmente tenemos los fructanos de tipo mixto o gramíneas cuando presenta los dos tipos de enlace (β -2,1 y β -2,6) y los neofructanos que poseen una molécula de glucosa interna en el polímero, estos dos tipos de fructanos son polímeros ramificados (Mancilla-Margalli y Lopéz, 2006)(Figura 7)

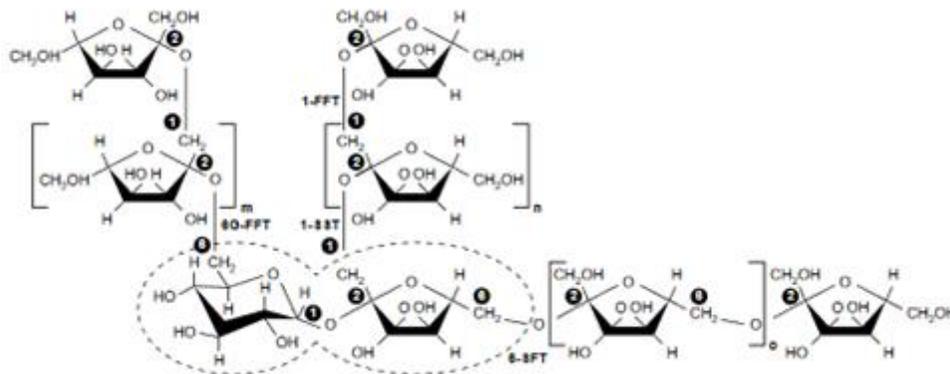


Figura 7. Estructura de fructanos ramificadas. La sacarosa que sirve como semilla de síntesis está circulada. Fuente: Ritsema & Smeekens, 2003

En este trabajo se emplearon dos diferentes tipos de fructanos:

a) Inulina:

Extraída principalmente de la raíz de achicoria. La inulina es un polímero lineal de fructosas unidas por un enlace β -2,1 fucosil-fructosa, con una molécula de glucosa terminal y con un grado de polimerización de 2 a 60 unidades de fructosa. Es ampliamente usada en la industria alimenticia como modificador de textura y remplazo de grasa, pero principalmente se usa como prebiótico, ya que debido a su enlace β -2,1 la hace indigerible para el humano pero para la microbiota intestinal como el género *Lactobacillus* son capaces de hidrolizar la inulina y metabolizarla. (Mensink et al, 2015)

b) Agavina:

El término agavina fue acuñado por la Dra. Mercedes G. López en 2006 (Mancilla-Margalli y López, 2006). Hace referencia a los fructanos presentes en plantas del orden de los *Asparagales*, al cual pertenece el agave.

Estos fructanos consisten en una mezcla compleja de fructooligosacáridos con enlaces tipo β -2,1, β -2,6 y ramificaciones, que pueden ser clasificados como gramíneas y neofructanos ramificados. Estos fructanos no son del tipo inulina como se pensaba anteriormente (Lopez, Mancilla-Margalli, & Mendoza-Diaz, 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006).

2.6.3. Fructanos en la camaronicultura

Los prebióticos en la acuicultura se han visto como una alternativa al uso de antibióticos para el control de enfermedades que puedan afectar los rendimientos de la producción, como modificadores de la microbiota intestinal y como mejoradores del rendimiento en el crecimiento de las especies marinas (Akhter, Wu, Memon, & Mohsin, 2015). Los prebióticos estudiados en acuicultura han sido los mananoligosacáridos (MOS), fructooligosacáridos (FOS), arabinoxilanos (AXOS), galactooligosacáridos (GOS), quitosanoligosacáridos (COS), la inulina y almidón modificado, entre otros (Akhter et al., 2015; Huynh et al., 2017; Song et al., 2014). La Tabla 2 presenta estudios realizados en post-larva de *P. vannamei* empleando fructanos como prebióticos, que representan antecedentes directos para este trabajo.

Tabla 2. Uso de fructanos como prebiótico en el cultivo de *P. vannamei*.

Fructano	Dosis	Duración	Resultados	Referencia
FOS	0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 %	6 semanas	=ganancia de peso, =supervivencia. +CTH, +explosión respiratoria, +PO. Hubo cambios en la microbiota intestinal.	P. Li et al., 2007
FOS	0.04, 0.08, 0.12, 0.16%	8 semanas	-FCA y +SGR en todas las dosis probadas. Concentración de 0.08%: + bacterias probióticas (<i>S. fecalis</i> y <i>Lactobacillus</i> sp.). Sin embargo, bacterias potencialmente patógenas no disminuyeron su abundancia (<i>V. parahemolyticus</i> y <i>A. hydrophila</i>).	Z. Zhou et al., 2007
FOS	0.1, 0.2 y 0.4 %	6 semanas	Empleando 0.2 y 0.4%: +SGR, -FCA, +actividad amilasa y lipasa, AKP ACP y SOD. + diversidad microbiana, - patógenos como <i>V. tubiashii</i> , <i>V. parahemolyticus</i> y <i>Photobacterium damsela</i> . Comparando dietas con remplazo de harina de soya vs remplazo de harina de soya con prebiótico.	Hu et al., 2018
Inulina	0.5%	6 semanas	= cambio en el peso final. – presencia de <i>Vibrio</i> sp. en el intestino. =Supervivencia vs <i>V. alginolyticus</i> .	Ramírez et al., 2013
Inulina	0.25, 0.5, 1%	4 semanas	Concentración de 0.5 y 1%: +SGR y + ganancia de peso. + <i>Bacillus</i> , + <i>Pseudomonas</i> , + <i>Bacteriovorax</i> y – <i>Vibrio</i> . + proPO, + TLR 1,2,3	Y. Li et al., 2018
Inulina	0.1,0.2 y 0.4%	8 semanas	Concentración de 0.2 y 0.4%: =FCA, +SGR, peso final y + ganancia de peso, +CAT, -MDA, +PO, +ACP. Concentración de 0.4%: + phylum <i>Firmicutes</i> y + género <i>Bacillus</i> , +SOD y + amilasa.	L. Zhou et al., 2020
Agavina	0.125,0.25,0.5 y 1%	62 días	=SGR y supervivencia. = conteo de bacterias ácido lácticas. + PO, - prevalencia de WSSV en camarones con baja carga viral.	Luna-González et al., 2012
Agavina	0.04 y 0.8%	54 días	= SGR y = supervivencia. +CTH,+ supervivencia frente WSSV, - prevalencia de WSSV al combinar 0.8% de agavina con 10 ⁵ UFC/g de probiotico	Partida-Arangure et al., 2013

Nota: FOS (fructooligosacáridos), FCA (factor de conversión alimenticio), SGR (tasa específica de crecimiento), SOD (superóxido dismutasa), TLR (receptores tipo Toll), PO (fenoloxidasa), proPO (profenoloxidasa), CTH (conteo total de hemocitos), CAT (catalasa), WSSV (virus de la mancha blanca), AKP (fosfatasa alcalina), ACP (fosfatasa acida), MDA (malondialdehido), = (sin cambio), + (aumenta), - (disminuye).

Usando FOS se observa que el efecto en el crecimiento del camarón fue caso dependiente. P. Li et al en 2007, no observaron una mejora en la ganancia de peso, pero observaron una mejora en la respuesta inmune. Z. Zhou et al. en 2007 obtuvieron una mejora en el SGR y una disminución del FCA de los camarones tratados con FOS en todas las concentraciones probadas y un aumento en la abundancia de bacterias probióticas *Streptococcus faecalis* y *Lactobacillus* sp. En 2018 Hu et al. encontraron que el uso de FOS favorece el aumento del SGR y una disminución del FCA empleando una concentración mayor a 0.1%.

Empleando inulina como prebiótico, el efecto en el crecimiento del camarón, al igual que en el caso de los FOS pareciera ser caso dependiente. Ya que Ramírez et al. 2013, son los únicos que no observan algún beneficio en el crecimiento del camarón al emplear la inulina como prebiótico en una concentración de 0.5%. Y. Li et al. en 2018 reporta una mejora en la ganancia en peso y SGR además de una mejora en la respuesta inmune. L. Zhou en 2020 en condiciones de baja salinidad observa una mejora en la ganancia en peso, peso final y SGR del camarón, pero sin cambios en el FCA.

De los reportes del uso de FOS e inulina, Y. Li et al. en 2018 y L. Zhou et al. en 2020 son los únicos en emplear técnicas de secuenciación masiva para evaluar la microbiota intestinal del camarón. Los demás reportes, emplean DGGE o técnicas dependientes de medios de cultivo. Sin embargo Y. Li et al. solo reportan un aumento en bacterias del género *Bcillus*, *Bacteriovorax*, *Pseudomonas* y descenso de *Vibrio* con respecto al control. Por el otro lado L. Zhou et al. en 2020 emplean inulina de la misma marca que se empleó en este trabajo (Orafti), no encuentran diferencia significativa en la diversidad alfa entre el control y 0.4% de inulina. En cuando a la taxonomía encuentran diferencialmente abundante en el tratamiento de 0.4% al género *Bacillus* lo cual coincide con el reporte de Li et al. en 2018.

El uso de la agavina como prebiótico en la dieta del camarón blanco del Pacífico no ha mostrado tener un efecto en los parámetros que evalúan el crecimiento del camarón, sin embargo, parece estimular la respuesta inmune del camarón aumentando el conteo total de hemocitos, la actividad de la fenoloxidasa y

aumentando su supervivencia frente al virus de la mancha blanca (Luna-González et al., 2012; Partida-Arangure et al., 2013). No hay reportes previos del efecto de la agavina en la microbiota del intestino o del hepatopáncreas de *P.vannamei* empleando secuenciación masiva.

3. HIPÓTESIS

La adición de fructanos al régimen alimentario del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* generará un cambio en la microbiota del intestino y del hepatopáncreas enriqueciendo bacterias con potencial probiótico y/o disminuyendo bacterias potencialmente patógenas.

4. OBJETIVOS

4.1.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la adición de fructanos al 2% (inulina y agavinas) en la microbiota del intestino y del hepatopáncreas de "*Litopenaeus vannamei*".

4.1.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto del uso de fructanos en el crecimiento del camarón blanco del Pacífico.
- Caracterización bioinformática de la microbiota del intestino y hepatopáncreas.
- Caracterización el efecto de la estructura de los diferentes fructanos y su relación con posibles cambios en la microbiota del intestino y hepatopáncreas.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Cultivo del camarón

El bioensayo se llevó a cabo en el estanque denominado “Mazatlán” en la granja camaronera “El Renacimiento”, ubicada ($26^{\circ}02'03.9''N$ $109^{\circ}23'47.1''W$) en el municipio de Ahome en el estado de Sinaloa. La Figura 8 muestra la imagen satelital de la granja en la que se llevó a cabo el bioensayo.



Figura 8. Vista satelital de la grana "El Renacimiento". El estanque en el que se llevó a cabo el bioensayo se señala con su nombre.

Se evaluaron cinco tratamientos los cuales se presentan en la Tabla 3. Estos alimentos fueron desarrollados en colaboración con el grupo del Agustín López-Munguía Canales del Instituto de Biotecnología de la UNAM que proporcionó la Inulina de marca Orafti, agavina comercial de marca PREVENTY extraída del agave azul la cual se denomina en este trabajo como agavina 2017 y agavina extraída de agave azul en su laboratorio, identificada en este trabajo como agavina 2016 y con el grupo de la Dra. Teresa Viana Castrillón del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC que elaboró todos los alimentos salvo el alimento comercial marca Provimi que es el empleado para alimentar a los camarones en la granja. La composición de cada formulación se presenta en la TablaS1 del material Anexo.

Tabla 3. Tratamientos empleados en el bioensayo.

Tratamiento	Característica
T1	Agavina 2016 al 2%
T2	Agavina 2017 al 2%
T3	Inulina al 2%
T4	Alimento comercial marca Provimi
T5	Alimento control

Se colocaron 22 camarones en una jaula de 1x1x1.5 m, por triplicado, dentro del estanque Mazatlan en la granja, en un régimen de cultivo semi-intensivo, alimentando a los camarones dos veces por día, en la mañana y en la tarde *ad libitum*, durante un periodo de tiempo de 28 días. Monitoreando el oxígeno disuelto y la temperatura a las 7:00 am y a las 5:00 pm. La Figura 9 ilustra como se colocaron las jaulas para llevar a cabo el bioensayo.

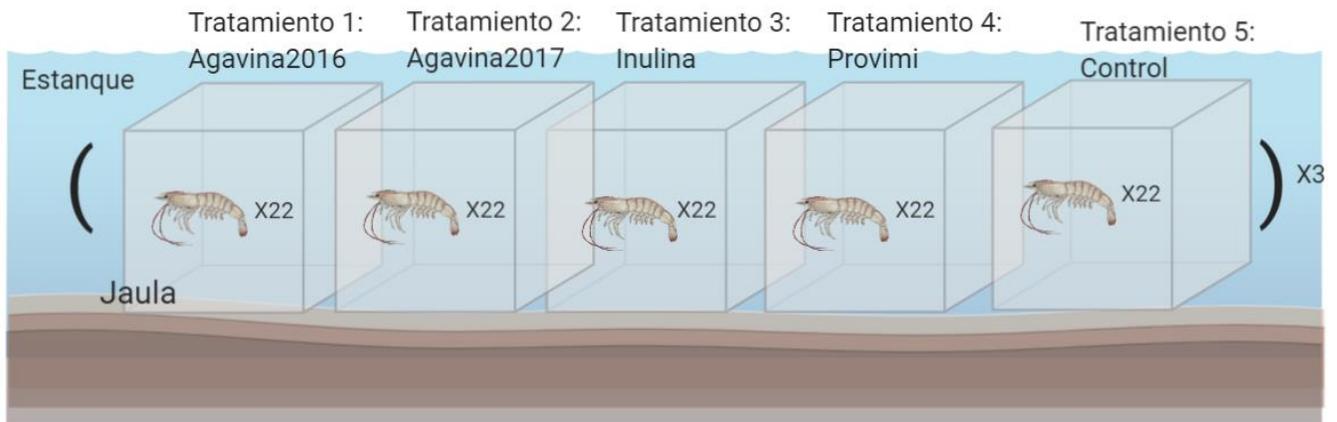


Figura 9. Esquema del diseño experimental del bioensayo.

Para evaluar el crecimiento del camarón se emplearon los siguientes parámetros:

- Factor de conversión alimenticio (FCA)

$$FCA = \frac{FI}{W_f}$$

- Índice de supervivencia

$$supervivencia = \frac{N_i}{N_f} \times 100$$

- Tasa específica de crecimiento

$$SGR = \frac{\ln(W_f) - \ln(W_i)}{t} \times 100$$

Dónde: W_f es el peso del camarón al final del bioensayo en gramos, W_i es el peso del camarón al inicio del bioensayo en gramos, FI es el alimento consumido durante el bioensayo en gramos y finalmente N_i y N_f es el número de camarones al inicio y al final del bioensayo respectivamente.

5.2. Extracción y cuantificación del ADN genómico.

La extracción se realizó mediante el Kit ZR Soil Microbe DNA Miniprep™ de Zymo Research siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

5.2.1. Extracción de ADN del intestino

Se seleccionaron tres intestinos por jaula de cada tratamiento, es decir, se realizaron un total de 45 extracciones de ADN de intestino. Se tomó la totalidad del intestino de cada una de las muestras y se realizó la extracción con el kit previamente mencionado. Finalmente se cuantificó el ADN extraído.

5.2.2. Extracción de ADN del hepatopáncreas

Debido al tamaño del órgano, la extracción de ADN se realizó de un fragmento del hepatopáncreas equivalente a 1/3 del tamaño del mismo, a diferencia del intestino en el que se usaba el órgano entero.

De igual forma que con el intestino se realizaron 45 extracciones individuales de ADN del hepatopáncreas pertenecientes a 3 muestras por jaula por cada tratamiento.

5.2.3. Cuantificación del ADN extraído

La concentración de DNA total extraído en cada una de las muestras, se realizó empleando el Qubit® dsDNA HS Assay Kit. En un tubo para PCR de 200 μ l se

colocaron 198 μL del Qubit® dsDNA HS Buffer, se añadió 1 μL de colorante Qubit® dsDNA HS Reagent y finalmente 1 μL de la muestra. Se leyó en el Qubit® Fluorometer 1.0 en modo High S. La concentración de DNA en la muestra es obtenida en unidades de ng/mL.

Posteriormente a la cuantificación de las muestras extraídas individualmente, se prepararon mezclas equimásico de ADN de cada jaula por tratamiento, para finalmente realizar la amplificación de la región V3-V4 del gen ribosomal 16s rRNA (Figura 10).

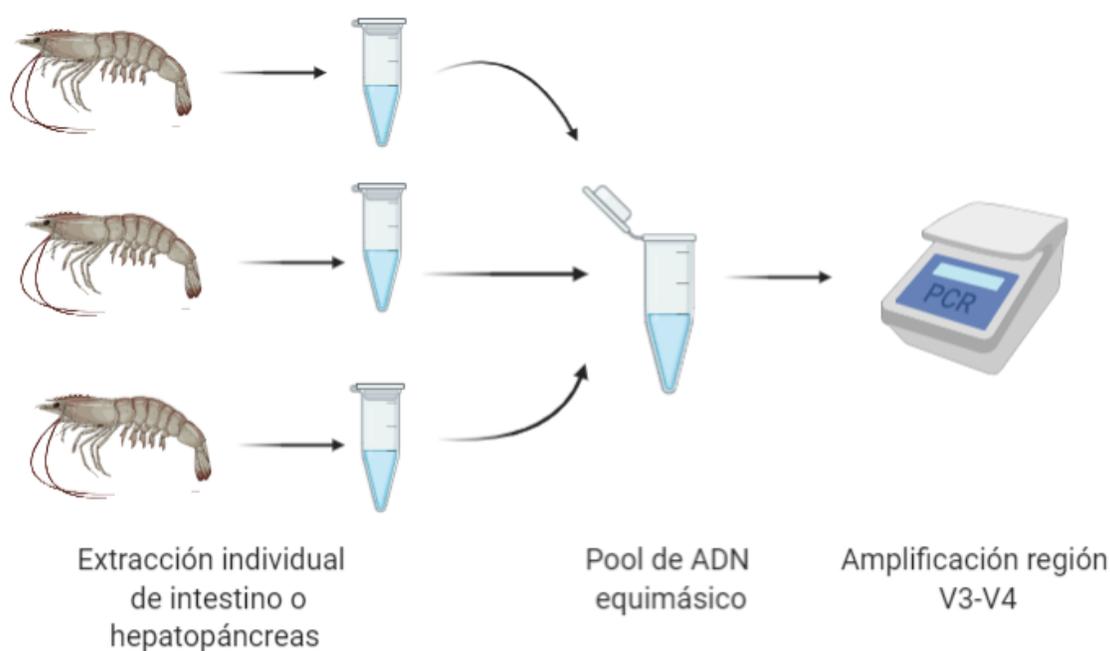


Figura 10. Diagrama de preparación de mezclas de ADN para posteriormente amplificar la región V3-V4.

5.3. Amplificación de la región V3-V4 del gen ribosomal 16s rRNA

Se amplificó mediante PCR, la región hipervariable V3-V4 del gen 16s de los pool elaborados previamente, de acuerdo con el protocolo *Illumina MiSeq 16s*, utilizando los oligonucleótidos:

341F:5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'

805R:5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Donde: H=A, C, T; V= A, C, G; W= A, T y N= A, T, C, G

Estos oligos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para llevar a cabo la reacción de PCR por muestra (pool de tres camarones por jaula) se emplearon 12.5 ng de ADN de la muestra del intestino o hepatopáncreas, se empleó la polimerasa **Q5® High-Fidelity 2X Master Mix** (NEB Next®). Las cantidades necesarias para una reacción por muestra se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Componentes de reacción de PCR.

Componente	Cantidad (µL)
ADN	X
Oligonucleotido Forward	1.6
Oligonucleotido Revers	1.6
Master Mix	10
Agua	1.8
Total	20

X: El volumen de ADN requerido para 12.5 ng dependiendo de la concentración a la cual se hizo el pool.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler de acuerdo con el siguiente programa: desnaturalización a 95°C durante tres minutos, 30 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, 72 °C durante 30 s y como extensión final 5 min a 72 °C.

5.4. Electroforesis en gel de agarosa

Con la finalidad de comprobar la presencia e integridad tanto del ADN genómico extraído como del resultado de la reacción de amplificación de la región V3-V4 del gen 16s rARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó de la siguiente manera:

- Preparación del gel: Para preparar 20 mL de agarosa se pesaban 10 g de agarosa y se disolvían en 20 mL de buffer TBE 1x.
- Carga del gel: se tomaron 4 µL de DNA, y se mezclaron con 3 µL del colorante GelRed™.

- Corrida del gel: se empleó TBE 1X como buffer de corrida, el gel se corrió por 15 min con un voltaje constante de 100 V.

5.5. Purificación de los productos de PCR

Una vez obtenido el producto de la reacción de PCR, la purificación de los fragmentos amplificados se realizó con perlas magnéticas AMPure XP. Para 20 μ L resultado de la reacción de PCR se adicionaron 25 μ L de perlas magnéticas previamente atemperadas, se colocó en el vortex a 5000 rpm por 2 min, se incubó a temperatura ambiente por 5 min para posteriormente separar las perlas magnéticas con ayuda de una gradilla magnética y realizar dos lavados con etanol al 80% frío. Finalmente, se eluyó el ADN purificado en agua grado biología molecular.

5.6. Secuenciación

Posteriormente a la purificación del amplicon, se prepararon las librerías siguiendo el protocolo Illumina para poder realizar la secuenciación paired end en la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) empleando la plataforma Illumina MiSeq™ system 2x250.

5.7. Análisis bioinformático de las secuencias

El análisis bioinformático se llevó a cabo de la siguiente manera:

5.7.1. Limpieza:

Se realizó el análisis de calidad de las secuencias empleando el programa fastQC, posteriormente se cortaron los primers de amplificación para las regiones 16S y adaptadores con el programa Cutadapt v2.0 . Con Prinseq v0.20.4 se filtraron las lecturas con baja entropía, incluidos homopolímeros y recortar los extremos 3' y 5' de baja calidad basado en puntajes de calidad de Phred ($q = 17$) (Schmieder & Edwards, 2011). Posteriormente con fastq-join (Aronesty, 2013) se unieron las lecturas R1 y R2 y finalmente al amplicón unido se le hizo una limpieza por ventanas empleando el programa Trimmomatic usando una ventana de 4 y un promedio de calidad de 20. Este protocolo fue el que permitió recuperar un mayor número de secuencias (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014).

5.7.2. Asignación taxonómica y análisis de diversidad

En esta parte del análisis se utilizó Qiime por sus siglas en inglés Quantitative Insights Into Microbial Ecology desarrollado por J. Gregory Caporaso y Rob Knight en su versión 1.9.1 (Caporaso et al., 2010).

Para la selección de OTU's (Operational Taxonomic Unit) y asignación taxonómica se empleó la opción de referencia cerrada con los parámetros de default, como referencia la base de datos de Greengenes versión 13_5 (http://greengenes.secondgenome.com/downloads/database/13_5) (McDonald et al., 2012).

La tabla biom obtenida se filtraron singletones, se filtraron al 0.005% de abundancia, posteriormente se filtraron los OTU's que no estuvieran en más del 50% de las muestras por tratamiento (2 de 3 muestras) (Figura 11).

OTU	A1	A2	A3	B1	B2	B3
OTU1	5	10	1	0	0	1
OTU2	1	0	0	0	1	0
OTU3	0	0	0	2	10	21

Tabla OTU

Tabla OTU filtrada

OTU	A1	A2	A3	B1	B2	B3
OTU1	5	10	1	0	0	1
OTU3	0	0	0	2	10	21

Figura 11. Ejemplo filtrado de la tabla OTU, cuyos OTU's estuvieran al menos en más del 50% de las muestras por tratamiento. Donde: A1-3 son tres muestras del tratamiento A y B1-3 tres muestras del tratamiento B.

Debido a la diferencia en profundidades de las librerías, se aplicó un método de estandarización a la tabla OTU realizando 100,000 repeticiones de Montecarlo (aleatorias, sin reemplazo, iteraciones de re-muestreo), usando el tamaño de la muestra más pequeña usando Vegan con scripts R (Jari Oksanen, 2020).

5.7.3. Análisis de diversidad alfa y beta

Los análisis de diversidad se realizaron empleando los scripts de Qiime versión 1.9.1. Para la diversidad alfa se evaluaron los índices de Shannon y Chao1, OTU's observados y goods coverage.

Para la diversidad beta se evaluó calculando la matriz de distancias de UNIFRAC ponderada y no ponderada.

5.7.4. Análisis de abundancia diferencial

Finalmente se hizo la búsqueda de bacterias diferencialmente abundantes entre los tratamientos mediante Lefse (Segata et al., 2011), se empleó la tabla biom filtrada y rarefaccionada previamente, tomando como significativos valores de $p < 0.05$ y un punto de corte en el análisis discriminante lineal (LDA por sus siglas en inglés) de 1.5.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis químico proximal de las dietas desarrolladas

Como se mencionó anteriormente para el bioensayo en colaboración con el grupo de la Dra Teresa Viana se elaboraron los alimentos a probar salvo por el alimento comercial Provimi. A continuación, se presenta un gráfico de araña en el cual se comparan los perfiles del análisis químico proximal proporcionado por la Dra. Teresa Viana de las distintas dietas, dividido en proteína cruda, lípidos totales, extracto libre de nitrógeno (ELN) cuya principal composición son carbohidratos y cenizas.

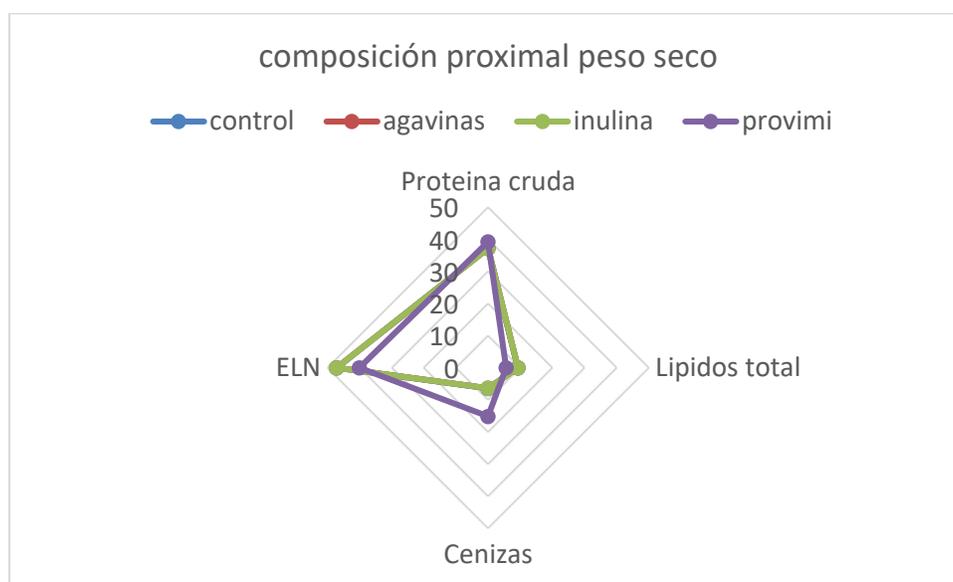


Figura 12. Gráfico de araña del análisis químico proximal de los tratamientos.

Se puede observar que los alimentos desarrollados para este bioensayo (Agavina2016, Agavina2017, Inulina y Control) presentan la misma composición química proximal ya que las curvas se eclipsan, por lo que en el gráfico se observan solo dos distintos perfiles, uno correspondiente a los alimentos desarrollados para el bioensayo y el segundo perfil perteneciente al alimento comercial empleado en la granja “Provimi”.

Uno de los componentes más importantes en la dieta del camarón para su desarrollo es la proteína, en ese sentido, el alimento comercial aporta 39.2% de proteína cruda,

lo cual representa un 2.02% más proteína que los otros cuatro tratamientos. Sin embargo todos los tratamientos aportan la proteína que se requiere para el desarrollo del camarón blanco del Pacífico la cual es de 20 a 40% (Ayisi, Hua, Apraku, Afriyie, & Kyei, 2017).

Para el camarón blanco del Pacífico se ha observado que valores entre 15%-25% de carbohidratos son óptimos para su desarrollo, en relación con esto, en la Figura 12 se presenta el extracto libre de nitrógeno (ELN) cuyo principal componente son los carbohidratos. El ELN para las dietas desarrolladas corresponde al 47.1% y para el alimento comercial 40.08%, para el alimento comercial la etiqueta no especifica la cantidad total de carbohidratos presentes en el alimento, en tanto que el resto de los tratamientos el 65% del ELN pertenece a carbohidratos es decir 37.1% del alimento desarrollado. Para el tratamiento control el almidón representa el total de carbohidratos mientras que para los alimentos a los cuales se les adiciona un fructano, 2% de almidón se sustituye con el fructano correspondiente a cada tratamiento, es decir, 35.1% es almidón y 2% del fructano en cuestión.

Por último, el alimento comercial está compuesto por 5.6% de lípidos mientras que el resto de los tratamientos está compuesto por un 9.2%. Se ha reportado que para el desarrollo de *L. vannamei* se requiere de 8 a 12% de lípidos en el alimento, el alimento comercial aporta 3% menos lípidos que lo que se ha observado favorece el desarrollo del camarón, mientras que el resto de los alimentos se mantiene dentro del intervalo descrito como óptimo.

6.2. Caracterización de los fructanos adicionados a la dieta

Los fructanos empleados en este estudio se caracterizaron con el fin de poder de relacionar posibles cambios en la microbiota con la estructura del mismo.

Para la caracterización se emplearon dos cromatografías. La primera fue una cromatografía de exclusión de tamaños con el fin de conocer el peso molecular de los fructanos empleados en el bioensayo. La segunda fue una cromatografía de intercambio aniónico acoplado a detector amperométrico, para conocer las estructuras de los fructanos.

6.2.1. Cromatografía de exclusión de tamaño (GPC)

Con el fin de conocer el peso molecular se realizó una cromatografía de exclusión de tamaño. Se construyó una curva patrón en función del peso molecular y el tiempo de retención la cual se muestra en la sección de Anexo (TablaS2 y FiguraS1) así como los cromatogramas de fructanos analizados (FiguraS2).

Se calculó el peso molecular promedio en número (Mn), peso molecular promedio en peso (Mw) el índice de polidispersidad (PDI) y el grado de polimerización (GP = GPn). Mediante las ecuaciones reportadas en PROY-NOM-002-SAGARPA-2015 que es un proyecto de norma oficial mexicana relativa al análisis de los fructanos de agave.

El peso molecular de cada fructano se reporta en la Tabla 5.

Tabla 5. Peso molecular de los fructanos

Fructano	Mw	Mn	PDI	GPn = GP
Inulina	7101.46879	4,251.41	1.67	24
Agavina2016	5893.42234	3,000.40	1.96	17
Agavina2017	5742.39537	2,759.08	2.08	15

Se encontró que la inulina es el fructano de mayor peso molecular promedio Mn seguida de la Agavina2016 y finalmente la Agavina2017. El PDI cuantifica la amplitud de la Curva de Distribución de Pesos Moleculares, entre más cercano a 1 indica que el polímero analizado posee solo cadenas del mismo peso molecular. Por lo que podemos decir que la agavina2017 tiene un mayor número de estructuras moleculares con diferentes pesos moleculares, en otras palabras es una mezcla de moléculas de diferentes cadenas de fructosa con diferente peso molecular .

Los pesos moleculares obtenidos para las agavinas se encuentran dentro los valores reportados por Lopez, Mancilla-Margalli en 2003 donde analizan agavina extraída de agaves de 8 años de edad y reportan un peso molecular que oscila entre 527- 4,739 g/mol. Moreno-Vilet en 2019 analiza diferentes muestras de agavina, entre ellas una muestra comercial, con un peso molecular de 2510.8 g/mol. Así

mismo los datos obtenidos para el GP coinciden con lo previamente reportado (Lopez et al., 2003; Moreno-Vilet et al., 2019).

6.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico acoplado a detector amperométrico.

La Figura 13 presenta el cromatograma obtenido por intercambio aniónico. El cromatograma de la inulina se presenta en verde, mientras que el de la agavina 2017 en morado, en azul el cromatograma de la agavina 2016 y finalmente en rojo el estándar comercial de orafti.

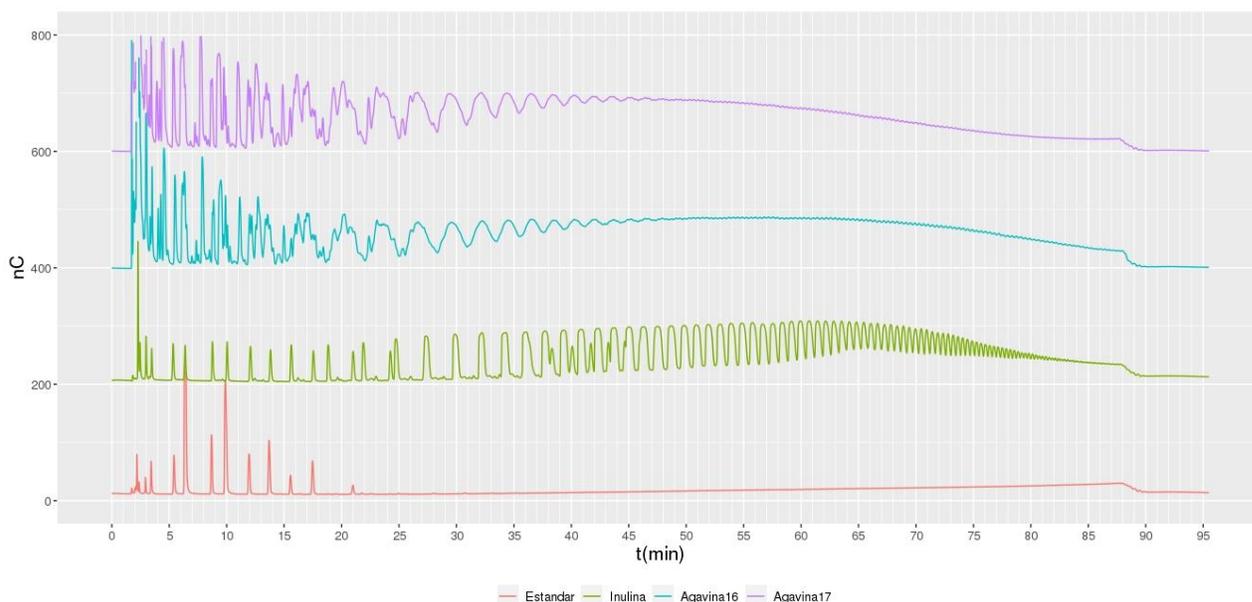


Figura 13. HPAEC-PAD de los fructanos. Estándar comercial en rojo, Inulina en verde, Agavina2016 en azul y Agavina2017 en morado.

A continuación, se presenta una tabla que resume que moléculas presentes en el estándar se encuentran en los fructanos empleados en este estudio. En verde se representan los compuestos identificados en los fructanos y en amarillo compuestos que posiblemente se encuentren ya que el pico a ese tiempo de retención no están lo suficientemente resuelto para asegurar que se trata de dicha molécula.

Tabla 6. Caracterización de las moléculas presentes en los fructanos empleados.

Tiempo de retención (min)	Molécula presente en el estándar	Agavina 2016	Agavina 2017	Inulina
2.2	Fructosa			
2.3	Sacarosa			
2.9	1-Kestosa GF2			
3.4	Inulobiosa F2			
5.4	Nistosa GF3			
6.3	Inulotriosa F3			
8.7	Fructosil-nistosa GF4			
9.8	Inulotetraosa F4			
11.9	Kestohexaosa GF5			
13.7	Inulopentaosa F5			
15.5	Kestoheptaosa GF6			
17.4	Inulohexaosa F6			
20.9	Inuloheptaosa F7			

A simple vista se observa que la inulina presenta un perfil completamente distinto a las agavinas esto es debido a que como se mencionó en los antecedentes, está formada únicamente por una estructura lineal de fructosas unidas mediante enlaces β -2,1; se identificaron fructooligosacáridos de grado de polimerización de 2 (1-kestos) a 7 unidades. Sin embargo, se observan picos con tiempo de retención superiores a 70 min, estos podrían ser moléculas de inulina de hasta con un GP de hasta 60 unidades (Mensink et al., 2015).

Los cromatogramas de las dos agavinas evaluadas, presentan el mismo patrón de picos en la cromatografía de intercambio aniónico. Analizando únicamente las señales de las agavinas, se identifican FOS con grados de polimerización superiores a los estándares empleados adicionalmente (Figura 14).

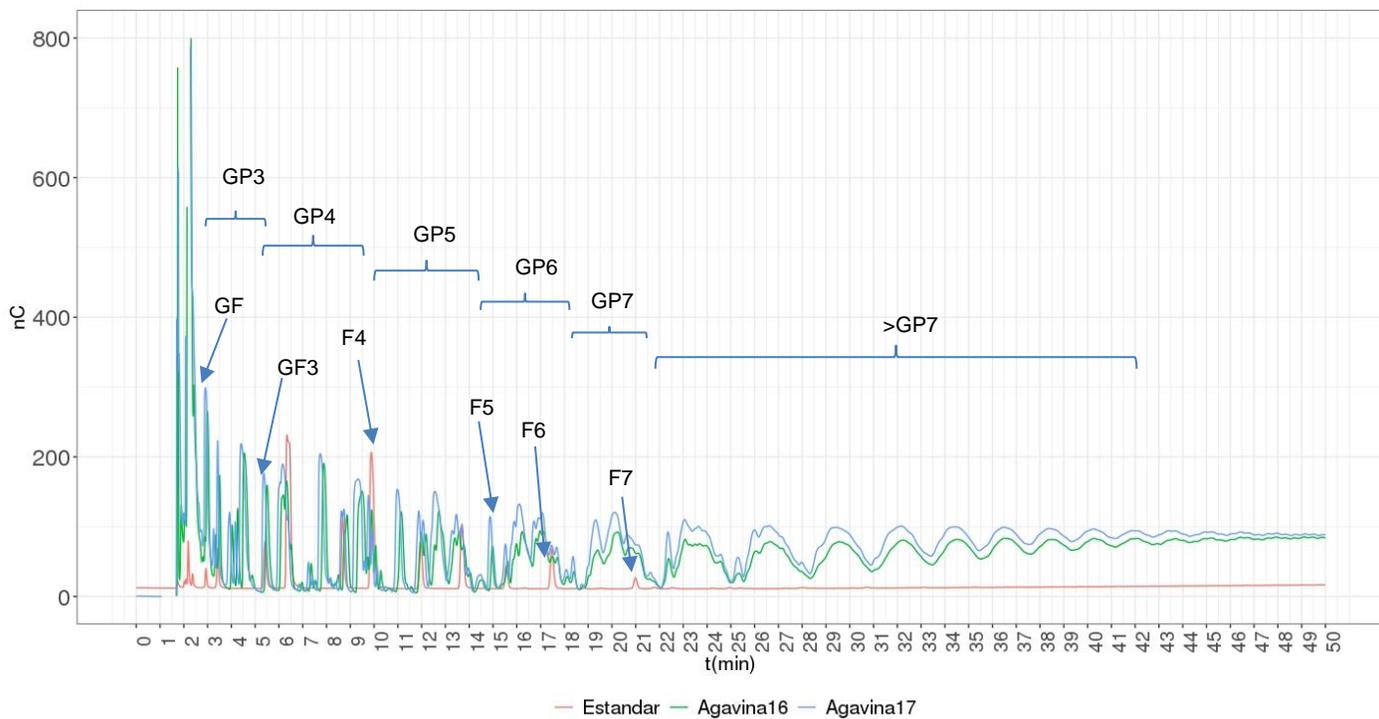


Figura 14. Comparación de agavinas HPAEC-PAD Estándar comercial en rojo, Agavina2016 en verde, Agavina2017 en azul.

Se observan picos intermedios entre los estándares empleados, estos corresponden a neofructanos y fructanos de tipo mixto; algunos de los cuales ya han sido identificados como son la bifurcosa, neonistosa, neopentosa (Mellado-Mojica, González de la Vara, & López, 2017)(Figura 15). Esto indica que en cuanto a las estructuras que componen a las agavinas, podría decirse son iguales dado el patrón del cromatograma de intercambio aniónico y la diferencia, la dictaría el peso molecular. Siendo la agavina 2016 de un mayor peso molecular que la agavina 2017.

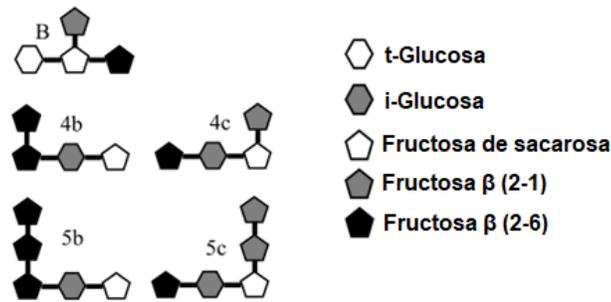


Figura 15. Algunos neofructanos y fructanos de tipo mixto identificados en agavina. Bifurcosa(B), neonistos(4b,4c), neopentosa(5b,5c). Modificado de Mellado-Mojica, González de la Vara, & López, 2017.

Se estimó la abundancia relativa de las especies señaladas en el cromatograma anterior con la ecuación reportada por Mellado-Mojica et al. en 2017 del grupo de la Dra. Mercedes G. López con la siguiente ecuación:

$$\%Abundancia\ relativa = \frac{\text{área del producto de interes (nCmin}^{-1})}{\text{total área (nCmin}^{-1})} \times 100$$

Tabla 7. Abundancia relativa estimada de las especies identificadas.

Producto de interes	Agavina2016 (%)	Agavina2017 (%)
Fructosa y sacarosa	5.86	5.2
DP3	8.2	7.85
DP4	5.1	4.42
DP5	5.4	6.1
DP6	5.52	5.93
DP7	5.75	6.11
DP>7	59.23	56.2

Dado el patrón del cromatograma de intercambio aniónico de las agavinas y a falta de una técnica más fina para elucidar estructuras como H¹-RMN, la diferencia, la dictaría el peso molecular y posiblemente el grado de ramificación que con las técnicas empleadas no se puede evaluar.

6.2.3. Estructuras de fructanos propuestas

Tomando en cuenta la estructura elucidada para la agavina (Lopez et al., 2003) y con la información recopilada por las dos cromatografías en la que principalmente se encuentra diferencia en el peso molecular se proponen las siguientes estructuras para los fructanos empleados para este proyecto:

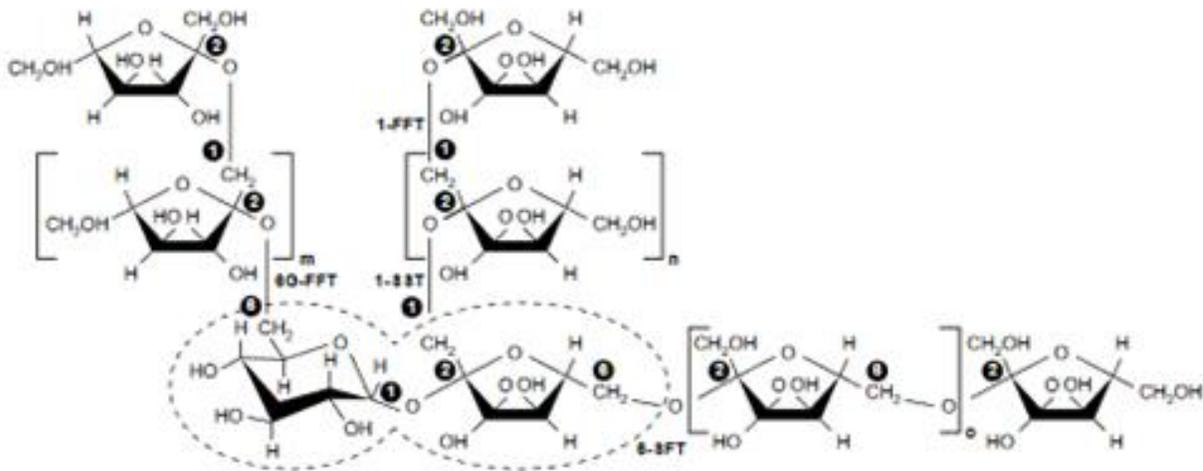


Figura 16. Estructura de Agavinas propuesta

Para la gavina 2016 es una mezcla de estructuras lineales y ramificadas con enlaces β -2,1 y β -2,6 con 17 unidades de fructosa. Mientras que para la agavina 2017 es una mezcla de estructuras lineales y ramificadas con enlaces β -2,1 y β -2,6 con 15 unidades de fructosa. Finalmente, la inulina empleada en el bioensayo en promedio son cadenas lineales con enlace β -2,1 con 24 unidades de fructosa.

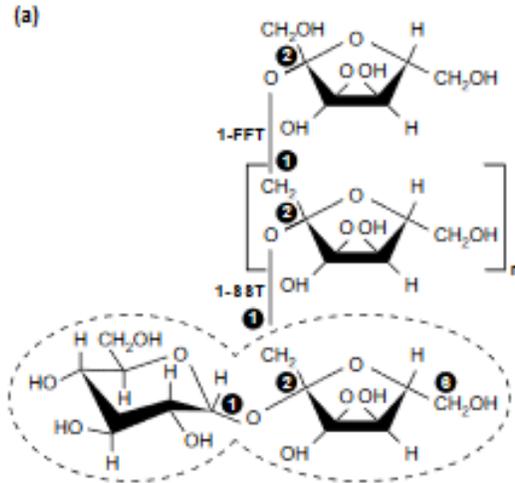


Figura 17. Estructura de inulina propuesta.

6.3. Cultivo de camarón

6.3.1. Calidad del agua durante el bioensayo

Durante el bioensayo se monitoreo el oxígeno disuelto y la temperatura del agua, los datos obtenidos se muestran en Figura 18.

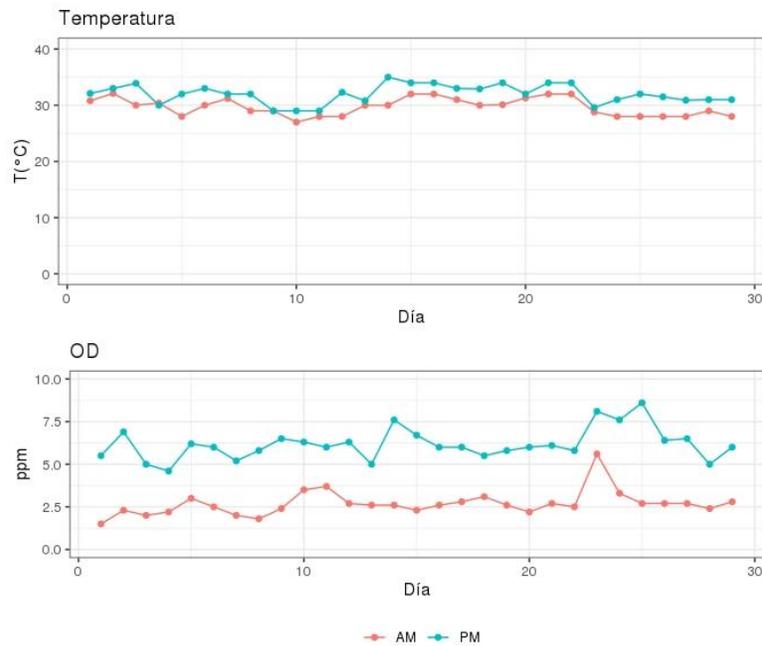


Figura 18. Registro de oxígeno disuelto y temperatura durante el bioensayo.

El oxígeno disuelto en promedio por la mañana fue de 2.7 ± 0.7 ppm y por la tarde fue 6.2 ± 0.9 ppm. Mientras que la temperatura promedio por la mañana fue de 29.7 ± 1.6 °C y por la tarde fue de 32 ± 1.7 °C. La solubilidad de gases en líquidos guarda una relación inversa a la temperatura, es decir, que, a mayor temperatura en el líquido, menor solubilidad del gas en él (ley de Henry); sin embargo, en este caso observamos que el oxígeno disuelto era mayor por la tarde a pesar de que en la tarde la temperatura promedio era 3 °C mayor que en la mañana. Esto probablemente se debe a la actividad fotosintética de microorganismos presentes en el estanque como pueden ser las cianobacterias.

El oxígeno disuelto y la temperatura son unos de los parámetros que ayudan a evaluar la calidad del agua en la acuicultura. Específicamente para el cultivo de *L. vannamei* los valores óptimos reportados para su cultivo para la temperatura se encuentra entre 25-30 °C (Mohanty, Ambast, Panigrahi, & Mandal, 2018), mientras que para el oxígeno disuelto el valor óptimo va de 4-9 ppm. Durante el bioensayo la temperatura por la tarde superó por 2 °C el límite superior del valor óptimo sin embargo esto no supone una temperatura que afecte el desarrollo del camarón blanco del Pacífico, por otro lado, el oxígeno disuelto por la mañana fue de 2 ppm que aun que es menor al límite inferior del intervalo óptimo, no supone riesgo para el cultivo de *L. vannamei* (Mohanty et al., 2018).

6.4. Evaluación de crecimiento del cultivo de camarón

El rendimiento en el crecimiento del camarón se evaluó con los siguientes parámetros: FCA, SGR, porcentaje de supervivencia, ganancia de peso en porcentaje (Figura 19).

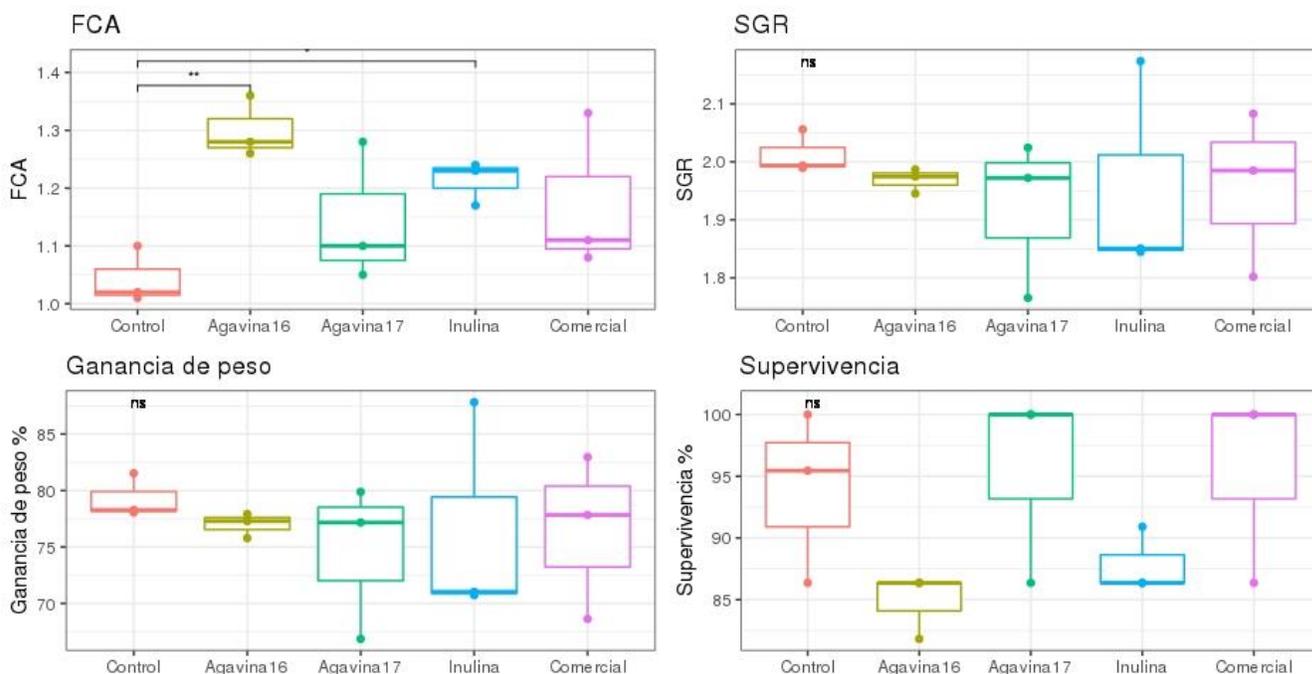


Figura 19. Evaluación del crecimiento del camarón

La adición de fructanos no influyo en el SGR y la ganancia en peso en porcentaje comparándolo con el control ya que no hubo diferencia significativa. Estos resultados obtenidos coinciden con lo reportado previamente por Luna-González et al., 2012 y Partida-Arangure et al., 2013 para las agavinas ya que su adición en el alimento del camarón no supuso una mejora en el SGR.

Para la inulina el comportamiento observado contradice lo reportado por Y. Li et al. en 2018 y ya que el sí encuentran un aumento en la ganancia en peso y el SGR sin embargo, el prueba 0.5 y 1% de inulina y lleva a cabo su ensayo en estanques de cemento en instalaciones techadas. L. Zhou et al. en 2020 de igual manera encuentran diferencia significativa en el SGR y la ganancia en peso siendo mejor al usar inulina en concentraciones de 0.2 y 0.4% en este último caso su bioensayo lo lleva a cabo por 8 semanas (el doble de tiempo comparado con nuestro bioensayo) y en condiciones de estrés de baja salinidad.

El FCA fue significativamente mayor ($p < 0.05$) para la dieta suplementada con inulina y Agavina16 comparándola contra el control; comparando el FCA del resto de tratamientos no hubo diferencia significativa. Este factor relaciona el alimento

consumido durante el bioensayo y el peso final del camarón. Siendo un valor cercano a 1 el valor óptimo ya que implicaría que todo el alimento consumido se fue a la generación de biomasa. Para la inulina, L. Zhou et al. en 2020 no observa diferencia significativa en los tratamientos de inulina con respecto a su control, esto difiere con lo que obtuvimos ya que en nuestro caso el FCA del tratamiento con inulina es significativamente mayor que el del control. Y. Li et al. en 2018 y Ramírez et al., 2013 no reportan el FCA, de igual forma ninguno de los dos reportes previos que emplean agavina reporta el FCA (Partida-Arangure et al., 2013).

Finalmente, la supervivencia tendió a ser menor para el tratamiento de inulina y Agavina16 sin llegar a ser significativa con respecto al control ni el alimento comercial.

Al solo comparar el peso final alcanzado por los camarones, vemos que no hay diferencia significativa entre los tratamientos a los cuales se les adicionó algún fructano con respecto al control. Sin embargo, al comparar el alimento consumido por los camarones; vemos que los que fueron alimentados con el alimento control consumieron significativamente menos alimento que los camarones del resto de los tratamientos, esto revela que el tratamiento control fue el mejor tratamiento concordando con los datos del FCA (Figura 20).

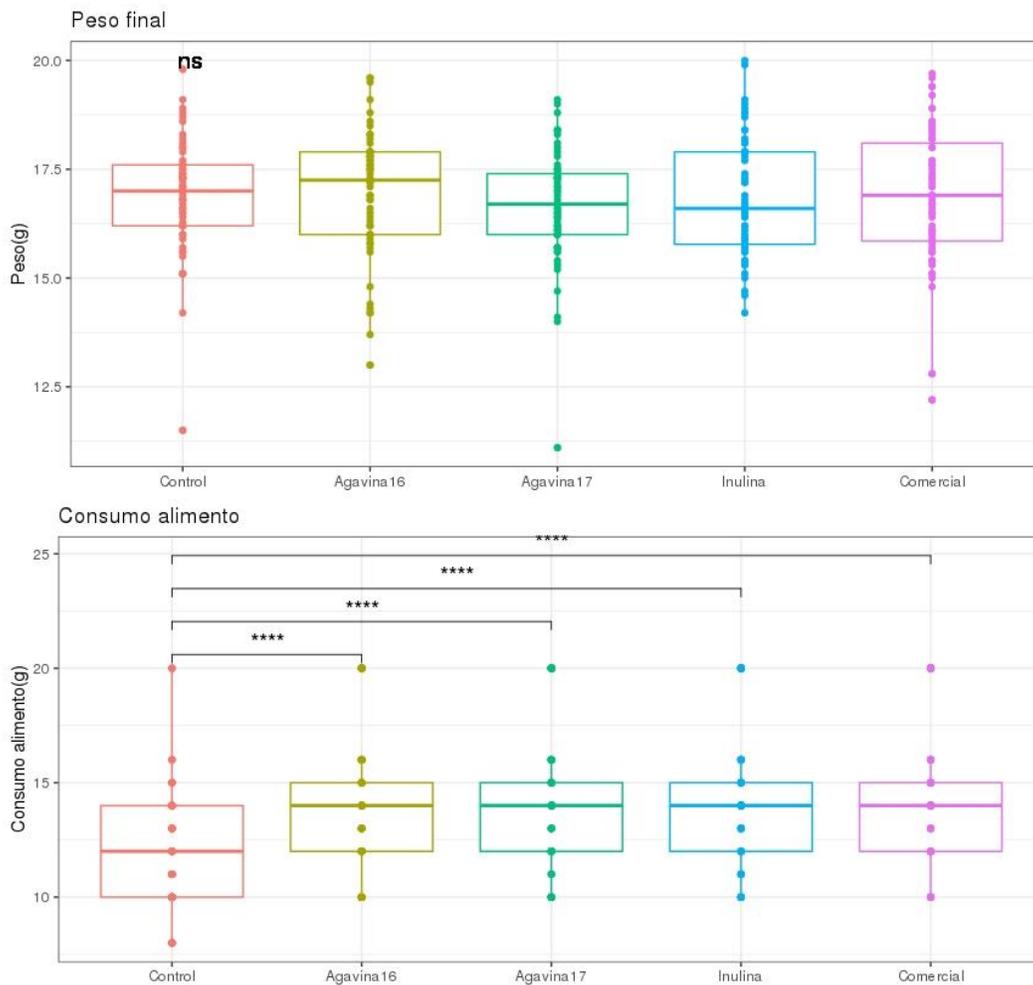


Figura 20. Peso final y consumo de alimento.

Los datos obtenidos coinciden con los obtenidos por Ramírez et al., 2013 en los que la adición de inulina no representó ningún beneficio para el peso final de los camarones, sin embargo, contradicen los obtenidos por L. Zhou et al., 2020 en los que ellos si ven influencia de la inulina pero esto puede deberse a que ellos someten al camarón a un estrés de baja salinidad. Para el uso de agavina, Luna-González et al., 2012 y Partida-Arangure et al., 2013 no reportan el peso final de sus bioensayos.

La adición de fructanos bajo las condiciones probadas en este trabajo ya sea del tipo inulina o agavina no supone una mejora en el performance del crecimiento del camarón blanco del Pacífico bajo las condiciones de cultivo empleadas. Al contrario, parece perjudicar la eficiencia del Factor de Conversión Alimenticia.

6.5. Análisis bioinformático de la microbiota intestinal y del hepatopáncreas

Para el análisis de la microbiota del intestino y el hepatopáncreas del camarón blanco del Pacífico de los pool de ADN obtenidos secuenciaron las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16s rRNA, como resultado de esa secuenciación se obtuvo un total de 1,477,197 lecturas crudas. Posteriormente a la limpieza, la asignación con QIIME y el filtrado de la tabla OTU como se describe en la metodología, se contó con un total de 451,718 secuencias. La Tabla 8 muestra un resumen del número de secuencias durante el procesamiento bioinformático.

Tabla 8. Resumen del procesamiento bioinformático: Lecturas antes de la limpieza y secuencias asignadas con QIIME v1.9.

Organo	Tratamiento	Secuencias crudas	Secuencias limpias	Asignadas
Hepatopancreas	T1	158,354	113,779	39,143
	T2	233,660	167,753	79,122
	T3	136,010	96,577	48,810
	T4	204,746	138,963	74,136
	T5	184,081	139,406	78,223
Intestino	T1	74,156	30,443	18,394
	T2	99,978	37,216	25,039
	T3	114,927	34,668	20,091
	T4	132,538	71,391	35,836
	T5	138,747	76,923	38,853
Total (%)		100%	61.41%	50.45%

Dada la baja profundidad en la secuenciación y el número de secuencias asignadas, se realizó una curva de rarefacción con el fin de comprobar que las muestras se lograron secuenciar en un grado suficiente para representar su verdadera diversidad (Figura 21). Se aprecia que a pesar de la baja profundidad en ninguna muestra se pierde información.

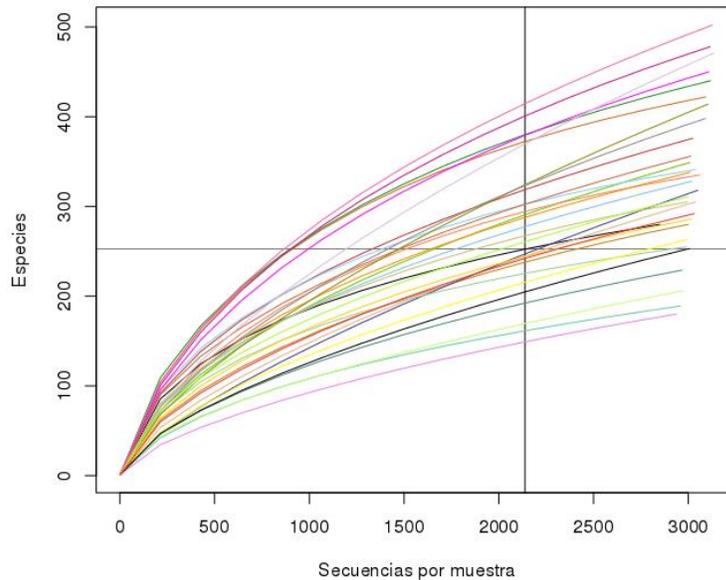


Figura 21. Curva de rarefacción por muestra.

Debido a la diferencia de profundidades entre las librerías (FiguraS3), se optó por rarefaccionar 100,000 veces las librerías a la profundidad de la librería más pequeña cuya profundidad era 2851 lecturas (FiguraS4) y para corroborar que dicho proceso no alteró lo observado por los datos originales, se comparó el total sum scaling a nivel de OTU de la muestra original vs la muestra rarefaccionada mediante una correlación de spearman, obteniendo $\rho=0.857 - 0.992$ por lo que se puede decir que este proceso no altera de manera significativa los datos y retrata de manera adecuada los datos originales. En el material suplementario se muestra el valor de las 15 muestras por órgano (FiguraS5 y FiguraS6).

6.5.1. Alfa diversidad

El análisis de diversidad alfa a nivel de OTU, se realizó con la tabla biom filtrada, rarefaccionando 10,000 veces a una profundidad de 2139 lecturas. Se evaluó el índice de Shannon, índice de Chao1, la diversidad filogenética (PD) y OTUs observados.

6.5.2. Efecto del órgano en la diversidad alfa

La Figura 22 presenta las métricas de alfa diversidad evaluadas y su relación con los órganos del camarón estudiados en este trabajo, independientemente del tratamiento al que fueron sometidos.

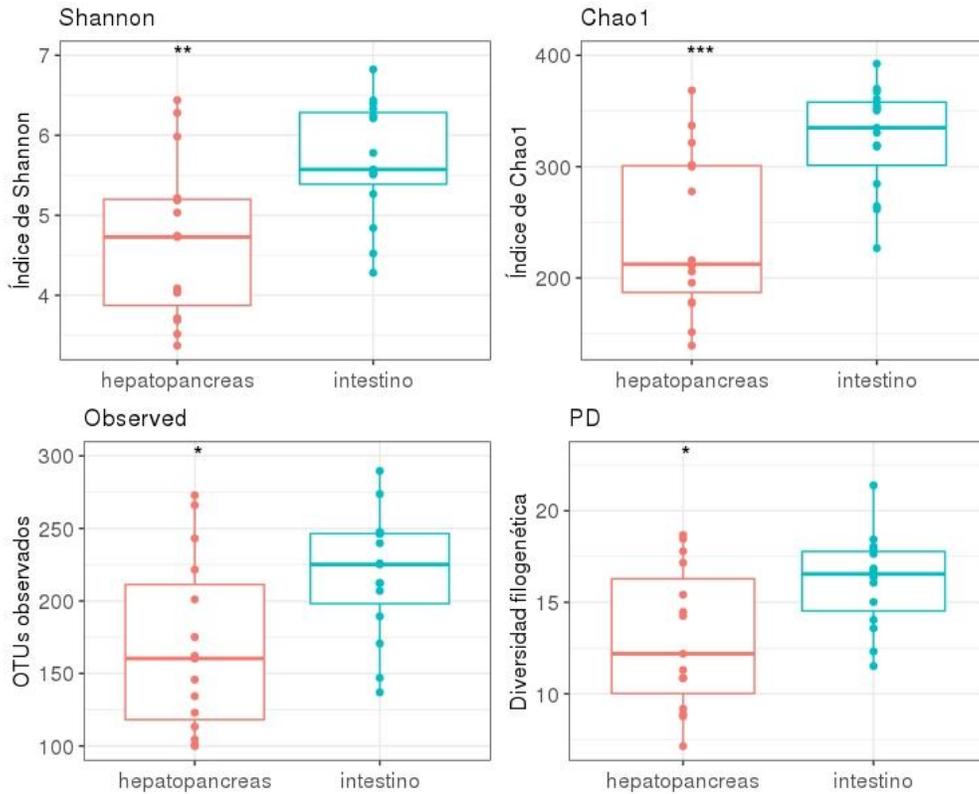


Figura 22. Efecto del órgano en la diversidad alfa.

La microbiota del intestino es significativamente más diversa $p < 0.05$ (Shannon) que la microbiota del hepatopáncreas. Esto coincide con lo reportado previamente por Cornejo-Granados et al., 2017, sin embargo, es opuesto a lo reportado por García-López et al., 2020.

De igual forma que la tendencia observada en el índice de Shannon, la microbiota del intestino es significativamente más rica $p\text{-valor} < 0.05$ que la del hepatopáncreas, lo cual concuerda con lo reportado por Cornejo-Granados et al., 2017 y también por García-López et al., 2020.

Cornejo-Granados et al., 2018 y 2017 observaron que el intestino es filogenéticamente más diverso p -valor <0.05 que el hepatopáncreas, sugiriendo una presión selectiva en la microbiota de este órgano. Los resultados de este proyecto concuerdan con lo reportado previamente, observamos que existe diferencia significativa en la diversidad filogenética (PD) entre la microbiota de intestino y la del hepatopáncreas, siendo el intestino más diverso independientemente de la dieta de los camarones.

6.5.3. Efecto del tratamiento en la diversidad alfa del intestino y el hepatopáncreas

6.5.3.1 Efecto de la suplementación con prebiótico

En este ejercicio se evalúa el efecto de la estructura del prebiótico en la microbiota del intestino (Figura 23; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y del hepatopáncreas (Figura 24; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

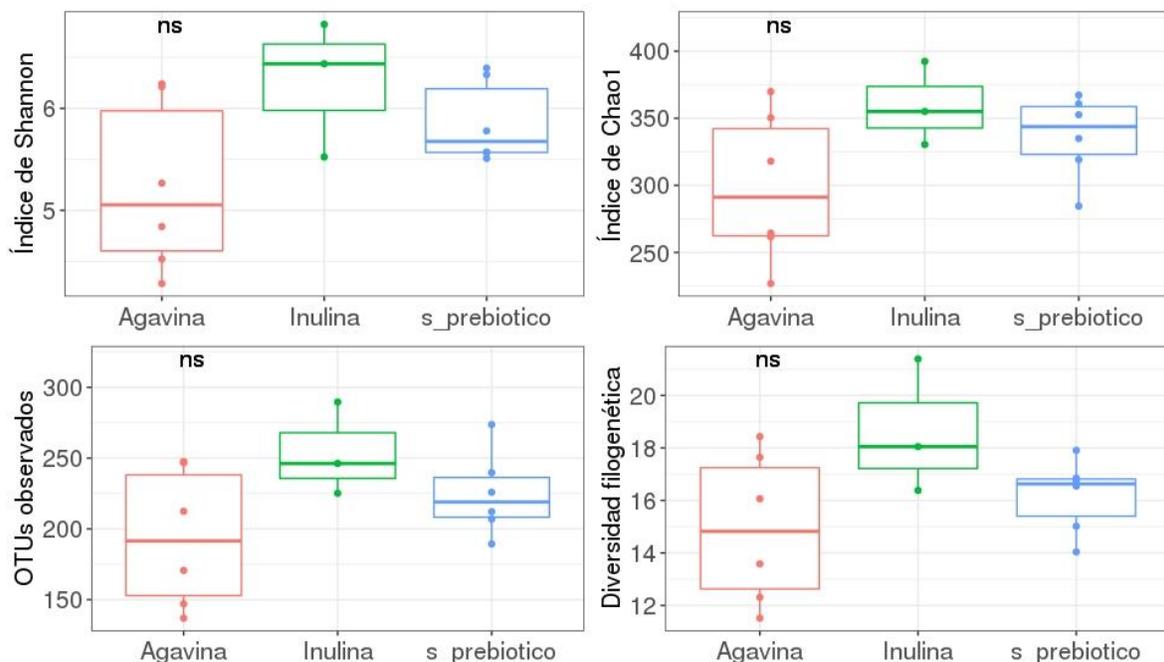


Figura 23. Efecto del suplemento con prebiótico en la diversidad alfa en el intestino.

Se puede observar que la microbiota intestinal tiende a ser más rica y diversa en los camarones tratados con inulina sin llegar a ser estadísticamente significativa. En los diferentes estudios donde se evalúa el efecto de una intervención dietaria (inulina,

fuentes de lípidos y fuentes de carbohidratos) en la microbiota intestinal del camarón blanco no se ve modificada de manera significativa su diversidad y riqueza (Qiao et al., 2017; M. Zhang et al., 2014; L. Zhou et al., 2020).

La diversidad y riqueza de la microbiota del hepatopáncreas no se ve afectada por la estructura del prebiótico (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.Figura 24).

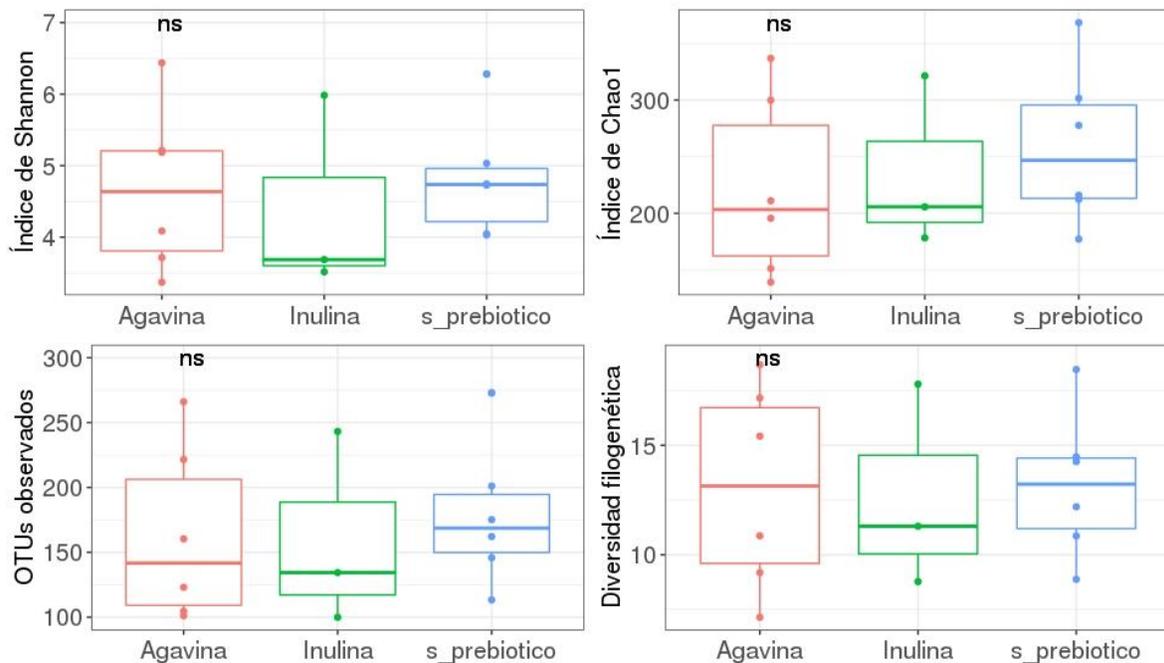


Figura 24. Efecto del suplemento con prebiótico en la diversidad alfa en el hepatopáncreas.

6.5.3.2 Efecto del tratamiento individual

Al evaluar cada uno de los tratamientos en la diversidad y riqueza del intestino, vemos que se conserva la tendencia de que el tratamiento con inulina tiene a ser más rico y diverso. Por otro lado, los tratamientos con agavina tienden a reducir la riqueza y diversidad de la microbiota comparándola con el control sin llegar a ser estas diferencias significativas. El tratamiento con agavina2017, sin ser significativo, tiende a ser menos rico y diverso con respecto al control.

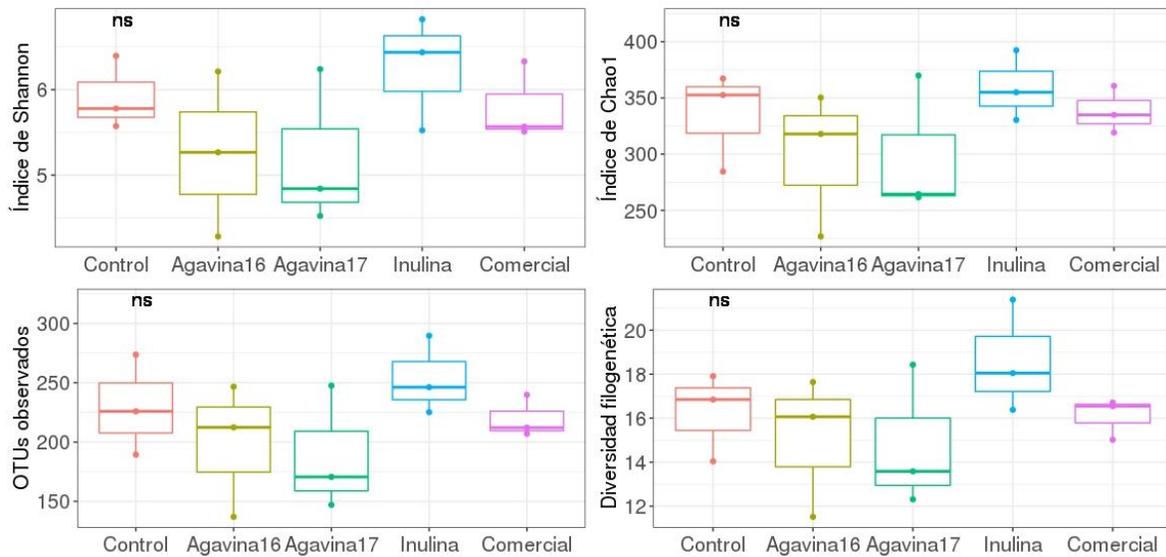


Figura 25. Efecto de los tratamientos en la diversidad alfa de la microbiota intestinal.

La microbiota del hepatopáncreas presenta una tendencia a ser menos diversa en los tratamientos elaborados para este bioensayo con respecto al alimento comercial. La diversidad y riqueza del tratamiento con Agavina16 tiende a ser mayor con respecto al control. La riqueza (índice de Chao1) presenta una tendencia a ser menor en los tratamientos desarrollados para este bioensayo con respecto al alimento comercial, siendo significativa esta diferencia entre el alimento control y agavina17 con respecto al comercial.

La diversidad filogenética presenta un comportamiento distinto, ya que es significativamente más diversa en los hepatopáncreas de los camarones alimentados con el alimento comercial (p -valor <0.05) con respecto a los alimentados con el tratamiento control (Figura 26; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). No hay reportes previos en el que estudien como la microbiota del hepatopáncreas del camarón se ve modificada por intervenciones dietarias.

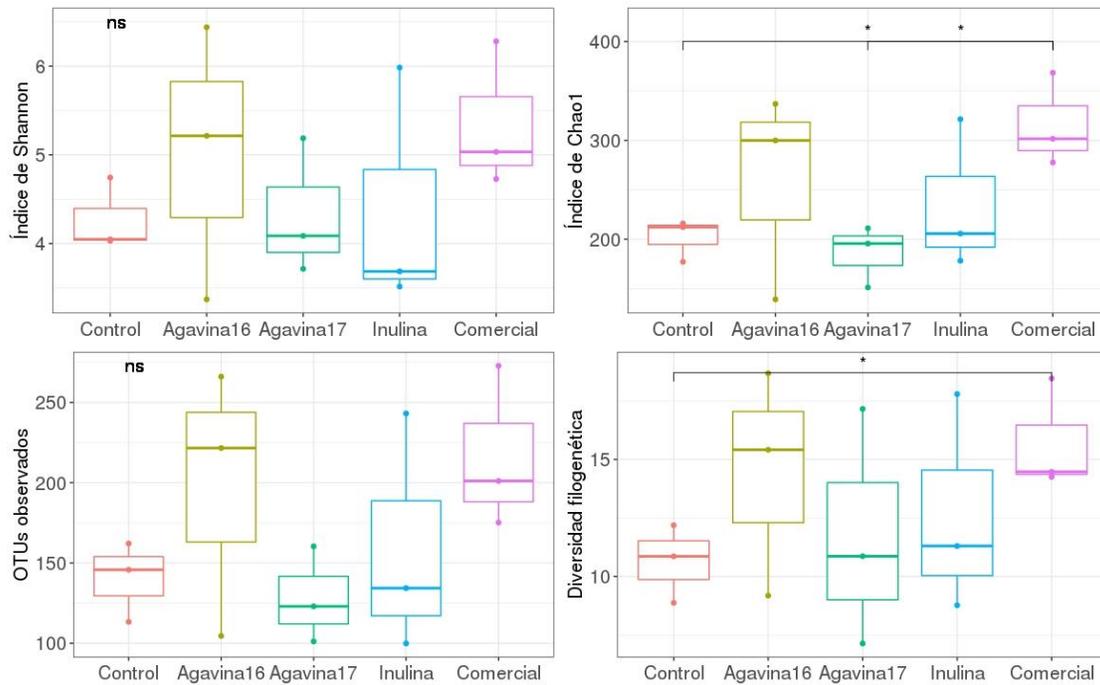


Figura 26. Efecto de los tratamientos en la diversidad alfa de la microbiota del hepatopáncreas.

6.5.1. Diversidad beta

Se llevó a cabo el análisis de diversidad beta para cada órgano, para determinar el efecto que tienen las distintas dietas experimentales tanto en los órganos estudiados, empleando la matriz UniFrac tanto weighted como unweighted.

En los gráficos de PCoA UniFrac unweighted (Figura 27) se pueden diferenciar dos clústers, uno perteneciente a las muestras de intestino y el otro a las muestras de hepatopáncreas, siendo significativamente diferentes (ANOSIM, $R=0.464$, $p=0.001$).

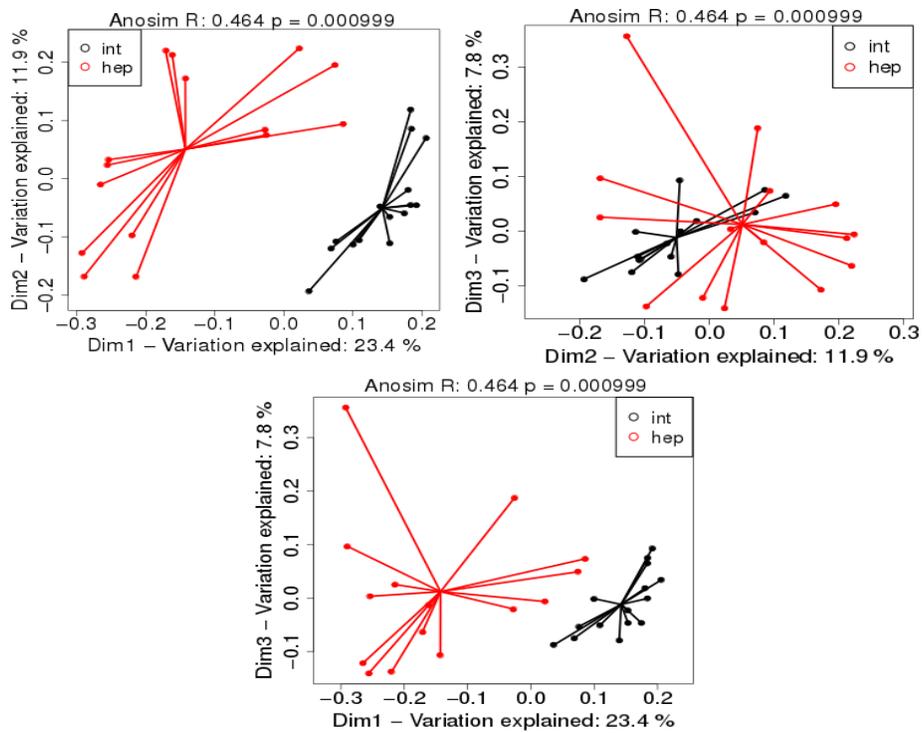


Figura 27. análisis de coordenadas principales (PCoA) empleando la matriz de distancia UniFrac unweighted.

Este mismo comportamiento se conserva haciendo el análisis con la matriz UniFrac weighted , el valor de R del análisis de ANOSIM es de 0.101 p-valor=0.045 (Figura 28)

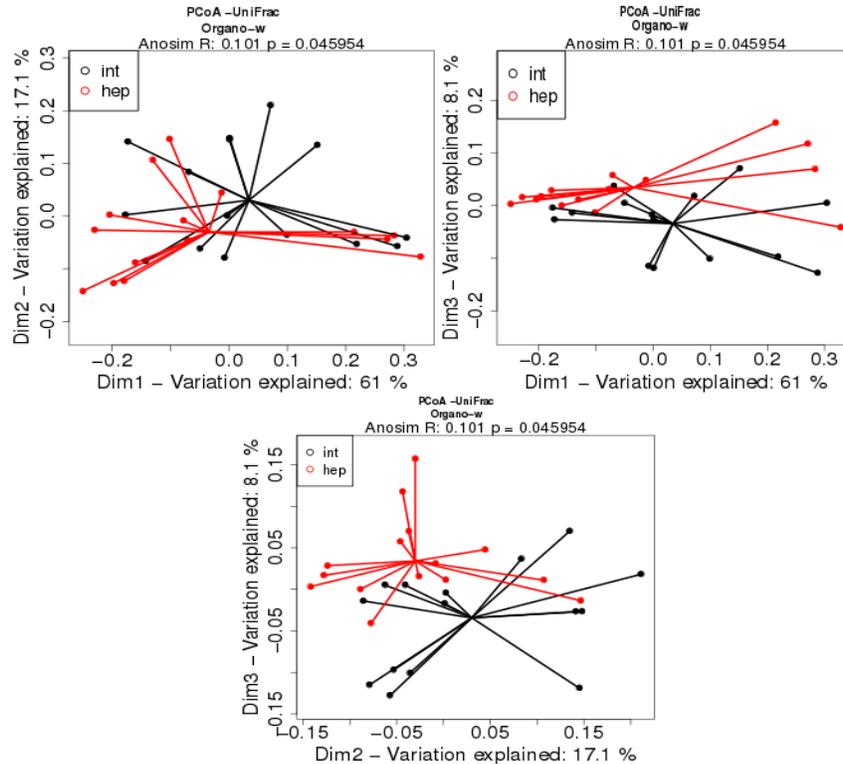


Figura 28. análisis de coordenadas principales (PCoA) empleando la matriz de distancia UniFrac weighted

Estos resultados indican una influencia del órgano en OTUs pero que al ponderar su abundancia la similitud entre grupos es menor. Coincidiendo con los estudios previos en los que comparan la microbiota de ambos órganos (Cornejo-Granados et al., 2018, 2017) en las que el órgano es uno de los factores principales en moldear la microbiota en el camarón..

6.5.1.1 Beta diversidad en el intestino

Evaluando el efecto del tratamiento individualmente en cada órgano se realizaron tres diferentes comparaciones: i) comparar si la composición de la microbiota se veía afectada por el uso de prebiótico (agrupando tratamientos con prebiótico vs tratamientos sin prebiótico). ii) comparar si la estructura del prebiótico alteraba la composición de la microbiota (agrupando agavinas vs inulina vs tratamiento sin prebiótico) y iii) comparando los tratamientos individuales.

Al emplear UniFrac unweighted no se encontró diferencia en la microbiota debida a los tratamientos en el intestino. Usando UniFrac unweighted de las primeras dos comparaciones encontramos que no hay diferencia significativa en la composición del microbiota, los resultados se muestran en el material anexo (FiguraS13 y FiguraS14). Finalmente comparando tratamientos individuales observamos que la composición de la microbiota intestinal (Figura 29; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), no se ve modificada por el efecto de algún tratamiento (ANOSIM, $R=0.08$, $p=0.22$).

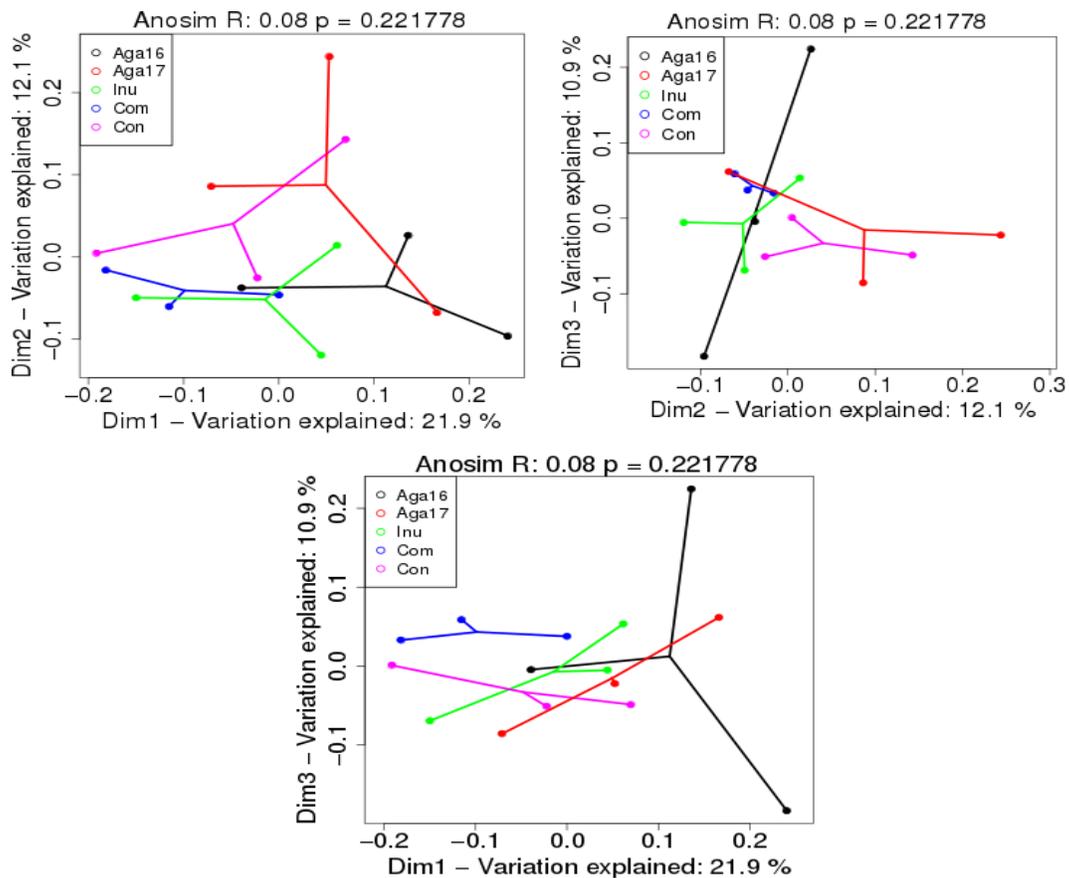


Figura 29. PCoA efecto de los tratamientos en la composición de la microbiota intestinal.

En estudios anteriores evaluando el efecto del uso de inulina en microbiota intestinal del camarón, encontraron que esta se ve modificada por el uso de inulina en concentración de 0.4%, sin embargo, esa diferencia podría deberse a las diferencias experimentales. Ya que en ese estudio los camarones tratados estaban separados en diferentes tanques, mientras que en este estudio las jaulas se encontraban

dentro del mismo estanque compartiendo sedimento que se ha observado guarda una estrecha relación con la microbiota intestinal del camarón (Cornejo-Granados et al., 2017; Huang et al., 2018).

6.5.1.2 Beta diversidad en el hepatopáncreas

Se realizaron las mismas comparaciones que con la microbiota intestinal: i) uso de prebiótico vs tratamientos sin prebiótico. ii) estructura del prebiótico y iii) tratamientos individuales. Los resultados de las dos primeras comparaciones se muestran en el material anexo (FiguraS15 y FiguraS16).

Al igual que en el intestino usando la matriz UniFrac ponderada no se encuentra diferencia en la microbiota en el hepatopáncreas debido a los tratamientos. Comparando el efecto del tratamiento en la composición de la microbiota del hepatopáncreas empleando UniFrac unweighted (Figura 30), encontramos que dicha composición se ve afectada debida a la dieta suministrada (ANOSIM, $R=0.231$, $p=0.03$).

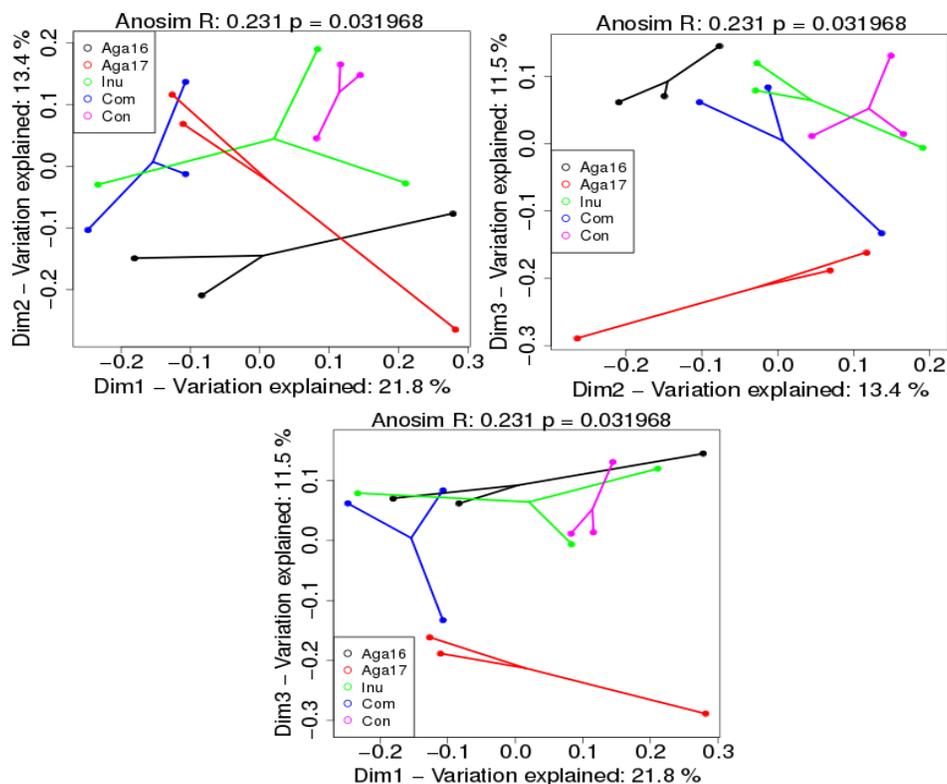


Figura 30. PCoA efecto de los tratamientos en la composición de la microbiota del hepatopáncreas.

Se realizó una prueba de homogeneidad de la dispersión multivariada usando la función betadisper, para descartar que la diferencia encontrada con la prueba ANOSIM, esté dada por la diferencia de dispersión entre los grupos. Betadisper compara distancias no euclidianas entre los conglomerados y el centroide de la clase a la que pertenecen, reduciendo las distancias originales a coordenadas principales. La prueba pareada de este análisis se corrió con la función permutest del paquete “vegan”. Encontrado que no hay diferencia significativa $p\text{-valor} > 0.05$ lo que indica que la dispersión entre los grupos es similar (Figura 31) y que la diferencia en la composición de la microbiota del hepatopáncreas está dada por la dieta suministrada a los camarones.

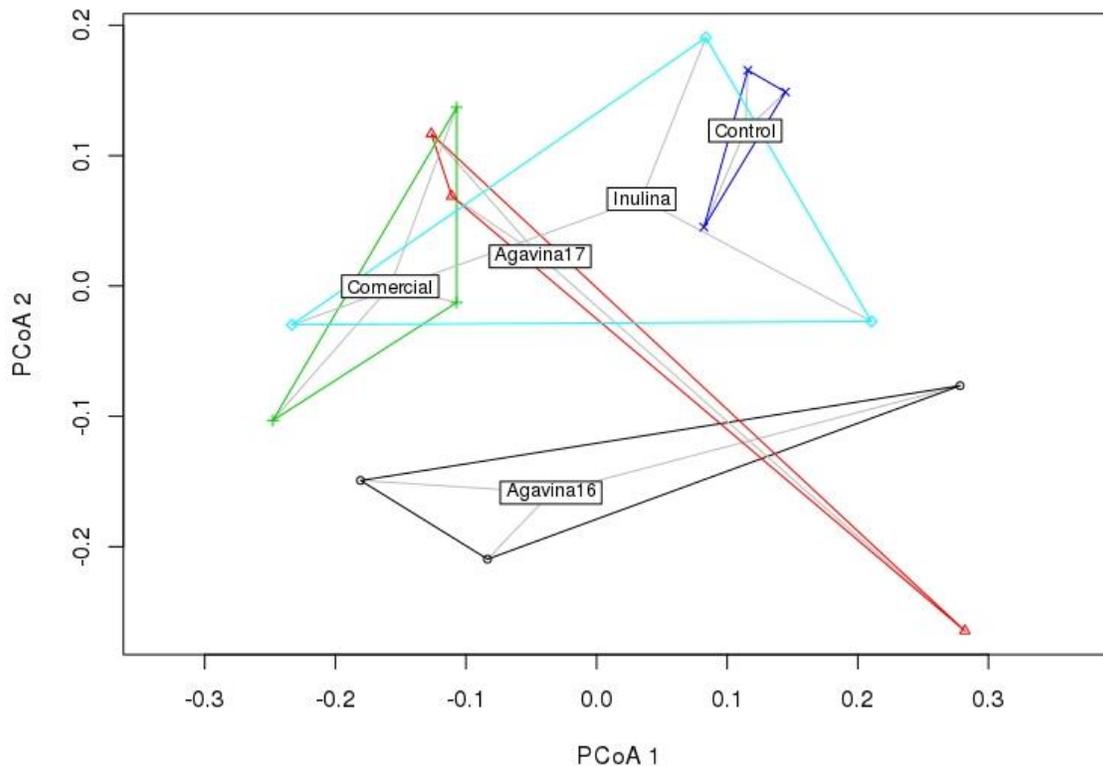


Figura 31. Homogeneidad multivariante de dispersiones de grupos.

No hay estudios previos que evalúen el efecto de la dieta en la composición de la microbiota del hepatopáncreas, sin embargo, este análisis sugiere que la microbiota del hepatopáncreas es más susceptible a verse modificada por la dieta que la microbiota intestinal bajo estas condiciones.

6.5.2. Taxonomía de la microbiota

Se obtuvieron un total de 664 OTU's y se distribuyeron de la siguiente manera: en el hepatopáncreas 554 OTU's y en el intestino 528. Los OTU's se asignaron a un total de 18 phylum, 41 clases, 74 órdenes, 117 familias y 164 géneros.

6.5.2.1 Microbiota intestinal

En la microbiota intestinal de manera general e independientemente del tratamiento observamos que los phylum más abundantes fueron: *Proteobacteria* (0.835-0.346), *Cyanobacteria* (0.050-0.502), *Fusobacteria* (0.001-0.289), *Planctomycetes* (0.007-0.104), *Actinobacteria* (0.010-0.0956) seguido de *Tenericutes* y *Verrucomicrobia* (Figura 32). Descritas previamente como parte normal de la microbiota intestinal del camarón blanco del Pacífico (Cornejo-Granados et al., 2017; Gainza et al., 2018; E. Li et al., 2018; Zeng et al., 2017).

A continuación, se presenta una tabla con los cinco phylum más abundantes en cada tratamiento (Tabla 9). Se destaca que el tratamiento con inulina disminuyó la abundancia del phylum *Fusobacteria* sacándola del top5 y en su lugar hay un aumento del phylum *Actinobacteria*.

Tabla 9. Cinco phylum más abundantes por tratamiento en el intestino la abundancia relativa promedio se presenta entre paréntesis.

AGAVINA16	AGAVINA17	INULINA	COMERCIAL	CONTROL
Proteobacteria (0.55)	Proteobacteria (0.55)	Proteobacteria (0.60)	Proteobacteria (0.54)	Proteobacteria (0.66)
Fusobacteria (0.19)	Cyanobacteria (0.25)	Cyanobacteria (0.3)	Cyanobacteria (0.21)	Cyanobacteria (0.15)
Cyanobacteria (0.15)	Fusobacteria (0.13)	Actinobacteria (0.06)	Fusobacteria (0.13)	Fusobacteria (0.08)
Tenericutes (0.04)	Actinobacteria (0.03)	Planctomycetes (0.05)	Planctomycetes (0.04)	Planctomycetes (0.04)
Planctomycetes (0.029)	Planctomycetes (0.019)	Tenericutes (0.008)	Actinobacteria (0.030)	Actinobacteria (0.035)

Si bien el phylum *Fusobacteria* se ha descrito antes como parte de la microbiota intestinal del camarón blanco del Pacífico, no se ha encontrado alguna relación entre este phylum y el desarrollo de alguna enfermedad en el camarón, solo se ha

encontrado en mayor abundancia en camarones cultivados en granja comparado con camarones cultivados en instalaciones techadas (Landsman et al., 2019).

En contraste con el resto de los tratamientos, el tratamiento con inulina el phylum *Actinobacteria*, se encuentra en tercer lugar de abundancia, esta fila se ha encontrado más abundante en camarones sanos con respecto enfermos y que esto podría representar una ventaja ya que especies de esta fila pueden proveer de antibióticos al hospedero otorgándole el beneficio de resistir el establecimiento de patógenos (Dai et al., 2018).

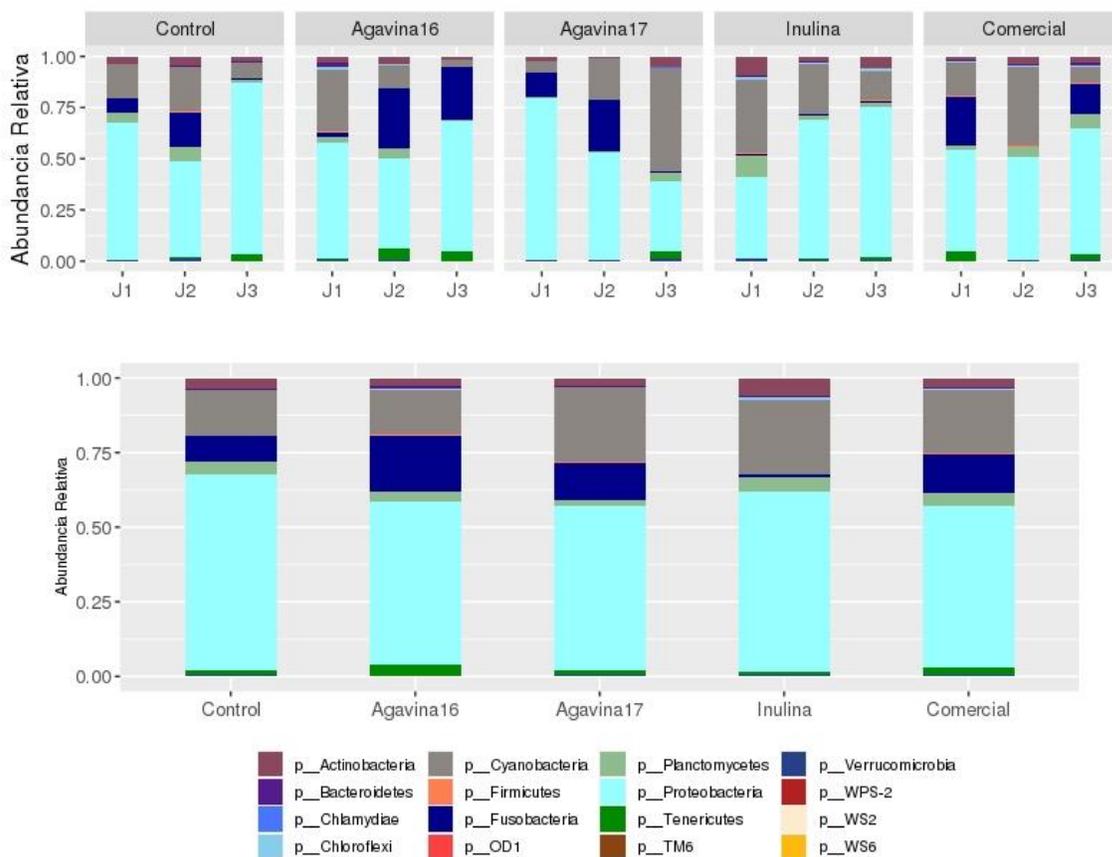


Figura 32. Abundancia relativa a nivel de phylum por muestra y por tratamiento.

En la Figura 33 se presenta el diagrama de Venn a nivel de phylum comparando los cinco tratamientos empleados. Se destaca que no hay phylum únicos para ningún

tratamiento; los tratamientos con prebiótico tampoco comparten phylum únicos entre ellos, no hay phylum compartidas entre los dos tratamientos con agavina. Sin embargo, el tratamiento agavina16 e inulina comparten la fila WS2 mientras que la inulina comparte la fila WS6 con el tratamiento de agavina17.

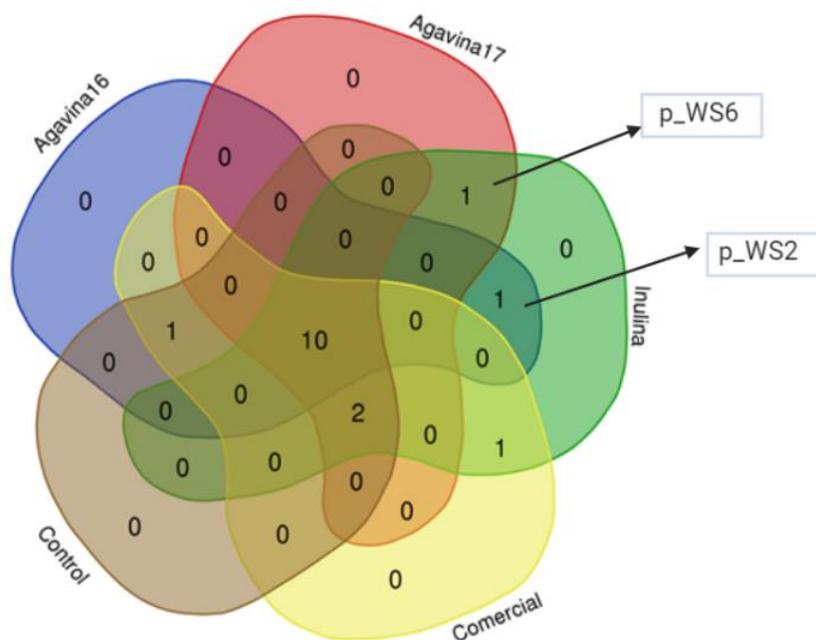


Figura 33. Diagrama de Venn a nivel de phylum en el intestino

A nivel de género los más abundantes en el intestino independientemente de tratamiento fueron: *Vibrio* (0.061-0.443), bacteria que pertenece a la familia *Pseudoalteromonadaceae* (0.019-0.375); bacteria sin asignación a género del orden *Stramenopiles* (0.014-0.091), *Propionigenium* (0.0-0.206), seguido de bacterias sin asignación a género perteneciente de la familia *Rhodobacteracea*, *Photobacterium*(0.012-0.418), y bacterias del género *Synechococcus*. La grafica de abundancia relativa por muestra y por tratamiento se muestra en la Figura 34.

En la tabla 9 se presenta la tabla con los diez géneros más abundantes por tratamiento.

Tabla 10. Diez géneros más abundantes por tratamiento en el intestino, la abundancia relativa se presenta entre paréntesis.

AGAVINA16	AGAVINA17	INULINA	COMERCIAL	CONTROL
g__Vibrio (0.199)	g__Vibrio (0.209)	f_Pseudoalteromonadaceae; g_ (0.206)	g__Vibrio (0.241)	g__Vibrio (0.279)
g__Propionigenium (0.121)	o_Stramenopiles;f__;g_ (0.205)	g__Vibrio (0.201)	o_Stramenopiles;f__;g_ (0.131)	f_Pseudoalteromonadaceae; g_ (0.166)
f__Pseudoalteromonadaceae; g_ (0.115)	f__Pseudoalteromonadaceae;g_ (0.164)	o__Stramenopiles;f__;g_ (0.142)	o__Fusobacteriales;f__;g_ (0.092)	f__Rhodobacteraceae;g_ (0.075)
g__Photobacterium (0.109)	g__Propionigenium (0.086)	g__Synechococcus (0.059)	f__Pseudoalteromonadaceae;g_ (0.073)	o__Stramenopiles;f__;g_ (0.061)
o__Stramenopiles;f__;g_ (0.095)	g__Photobacterium (0.041)	f__Rhodobacteraceae;g_ (0.054)	f__Rhodobacteraceae;g_ (0.058)	g__Synechococcus (0.049)
f__Rhodobacteraceae;g_ (0.042)	f__Rhodobacteraceae;g_ (0.037)	f__Pirellulaceae;g_ (0.035)	g__Pseudoalteromonas (0.041)	g__Propionigenium (0.042)
c__Mollicutes;o__;f__;g_ (0.038)	f__Vibrionaceae;g_ (0.033)	f__Rhodobacteraceae;Other (0.025)	g__Photobacterium (0.038)	o__Fusobacteriales;f__;g_ (0.035)
g__Psychrilyobacter (0.035)	g__Psychrilyobacter (0.031)	o__Actinomycetales;f__;g_ (0.023)	g__Synechococcus (0.037)	f__Pirellulaceae;g_ (0.032)
o__Fusobacteriales;f__;g_ (0.031)	g__Synechococcus (0.018)	f__Vibrionaceae;Other (0.022)	o__Pirellulales;f__Pirellulaceae;g_ (0.0348)	g__Photobacterium (0.023)
g__Synechococcus (0.027)	f__Pirellulaceae;g_ (0.015)	o__Chlorophyta;f__;g_ (0.019)	g__Propionigenium (0.0346)	f__Rhodobacteraceae;Other (0.021)

Lo destacable es la disminución de la abundancia de *Photobacterium* del tratamiento con inulina. Bacterias pertenecientes a este género han sido reportadas como patógeno oportunista (Singaravel, 2020; Vaseeharan et al., 2007) un ejemplo es que en la enfermedad del síndrome de heces blancas ya una vez desarrollada bacterias del género *Photobacterium* se asocia de manera negativa agravando la enfermedad (Dai et al, 2018).

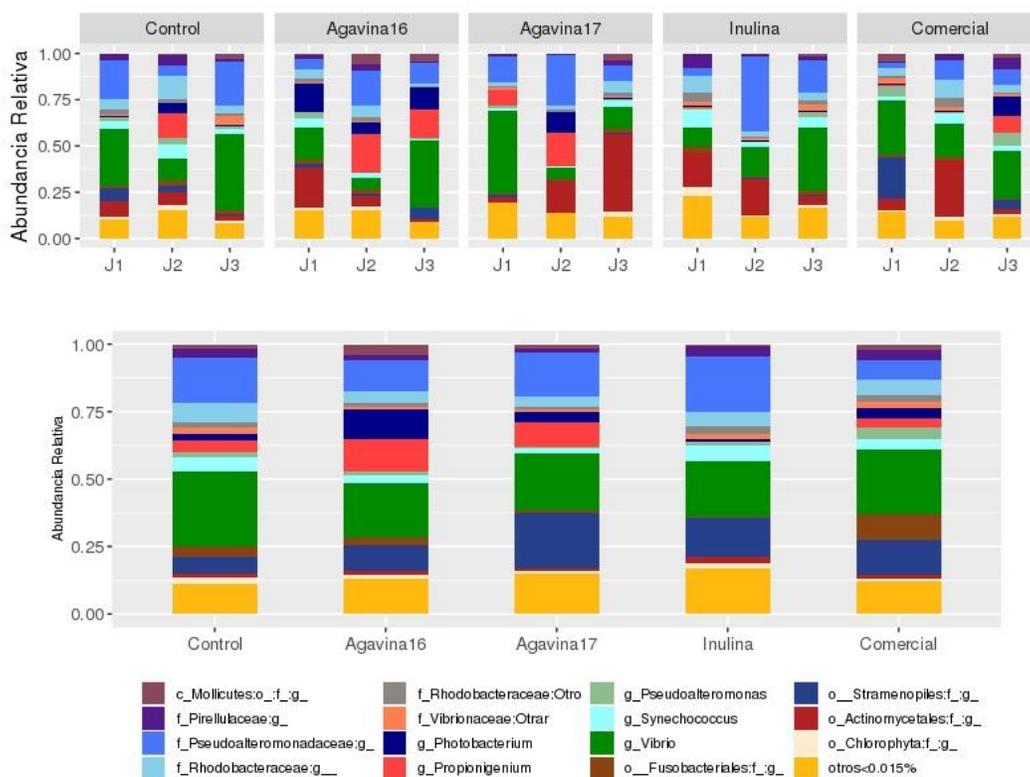


Figura 34. Perfil taxonómico de abundancia relativa a nivel de género en el intestino.

A nivel de género revisando el diagrama de Venn (Figura 35). Los alimentos desarrollados para este bioensayo comparten bacterias de un género sin asignar perteneciente al orden *HTCC2188* (*p_Proteobacteria*); los tratamientos con fructanos no comparten géneros de bacterias.

Los tratamientos con agavinas comparten un género de bacterias perteneciente a la familia *Micrococcaceae*. Esta familia pertenece al phylum *Actinobacteria* que en

camarones sanos se encuentra más abundante con respecto a camarones enfermos. La microbiota de los camarones alimentados con inulina comparte tres géneros de bacterias con la microbiota de los camarones alimentados con agavina 17 géneros sin asignar pertenecientes a la familia *Bradyrhizobiaceae*, clase SC72 y familia *wb1_P06* respectivamente. La microbiota de los camarones alimentados con el tratamiento agavina 16 y con el tratamiento con inulina comparten bacterias de la clase SHA-109 que no se llegan a asignar a género.

El tratamiento con inulina presenta tres géneros de bacteria no compartidos uno perteneciente a la familia *Nocardiopsaceae* y el género *Paracoccus* esta última solo se encontró presente en una muestra. Bacterias del género *Paracoccus* esta reportada como control en la calidad del agua en los estanques de acuicultura ya que se ha observado que llevan a cabo la conversión de nitratos a nitrógeno (Snozzi, 2000), en camarón se encontró más abundante en camarones sanos con respecto a los enfermos del síndrome de heces blancas (Dongwei Hou et al., 2018).

Finalmente, el tratamiento con agavina 17 registra dos géneros únicos, bacterias del género *Lactobacillus*, especies de este género han sido evaluadas como probiótico en la acuicultura y el cultivo del camarón blanco del Pacífico (Akhter et al., 2015; Huynh et al., 2017; van Hai & Fotedar, 2010) algunas especies del género *Lactobacillus* estudiadas son *L.plantarum* y *L.acidophilus* (van Hai & Fotedar, 2010). La segunda *Enterobacter* que podría ser de interés ya que bacterias como *Enterobacter hormaechei* ha sido reportada con potencial probiótico aislada de la carpa en India (Mukherjee & Ghosh, 2016) y *Enterobacter hominis* aislada de camarones cultivados en china fue evaluado como posible probiótico para camarón (Zuo et al., 2019). Sin embargo, ambos géneros solo están presentes en una muestra del tratamiento lo que equivaldría a tres camarones.

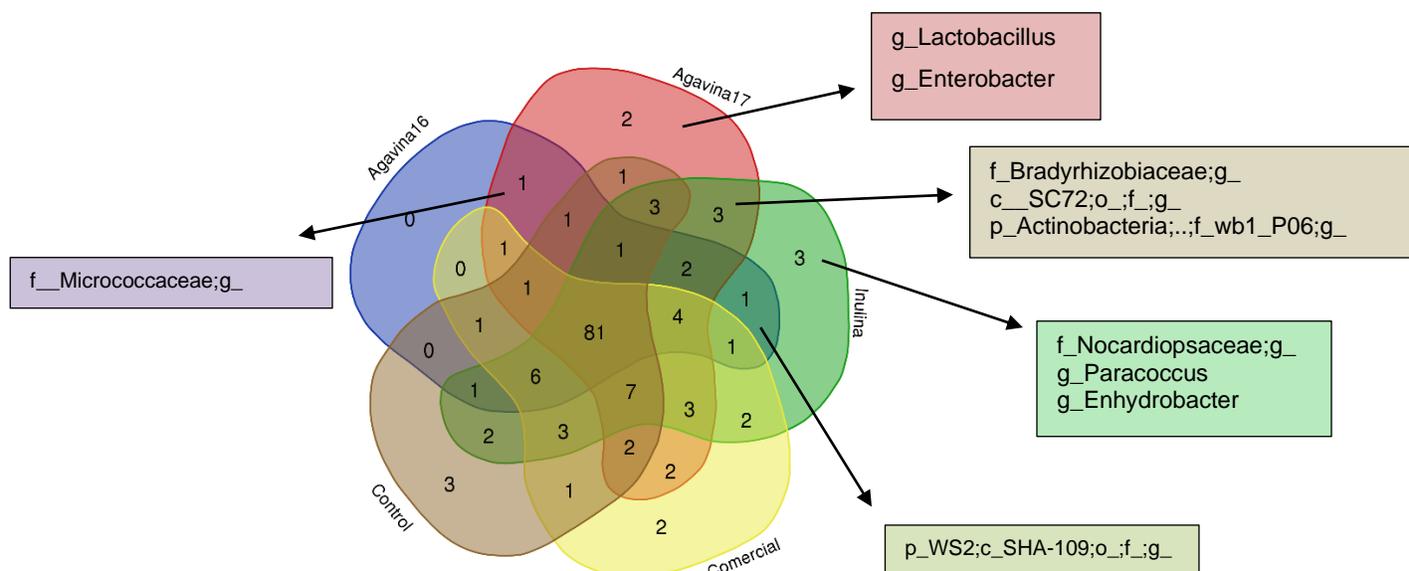


Figura 35. Diagrama de Venn a nivel de género en el intestino

6.6. Microbiota del hepatopáncreas

En la microbiota del hepatopáncreas de manera general los phylum más abundantes sin dividir por tratamientos son: *Proteobacteria* (0.330- 0.944), *Cyanobacteria* (0.037-0.515), *Fusobacteria* (0.0003-0.284), *Actinobacteria* (0.007-0.228) y *Planctomycetes* (0.001-0.089) seguidos de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Cabe destacar que dentro de las cinco phylum más abundantes entre tratamientos es constante y está formado por *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* y *Planctomycetes*, salvo en los camarones alimentados con inulina en el que la fila de *Fusobacteria*, ubicada en tercer lugar de abundancia en el resto de los tratamientos cae hasta el noveno lugar en abundancia, en su lugar sube en el quinto sitio de abundancia la fila *Firmicutes* para el tratamiento con este fructano. Y para el alimento control la fila *Planctomycetes* es sustituida por *Tenericutes* en el quinto lugar de abundancia (Figura 36 y Tabla 11).

Tabla 11. Cinco phylum más abundantes en el hepatopancreas, entre paréntesis se presenta la abundancia relativa.

AGAVINA16	AGAVINA17	INULINA	COMERCIAL	CONTROL
p_Proteobacteria (0.613)	p_Proteobacteria (0.578)	p_Proteobacteria (0.736)	p_Proteobacteria (0.591)	p_Proteobacteria (0.786)
p_Cyanobacteria (0.244)	p_Cyanobacteria (0.161)	p_Cyanobacteria (0.140)	p_Cyanobacteria (0.206)	p_Cyanobacteria (0.086)
p_Fusobacteria (0.046)	p_Fusobacteria (0.136)	p_Actinobacteria (0.081)	p_Fusobacteria (0.091)	p_Fusobacteria (0.062)
p_Actinobacteria (0.040)	p_Actinobacteria (0.063)	p_Planctomycetes (0.015)	p_Actinobacteria (0.049)	p_Actinobacteria (0.042)
p_Planctomycetes (0.023)	p_Planctomycetes (0.035)	p_Firmicutes (0.009)	p_Planctomycetes (0.031)	p_Tenericutes (0.007)

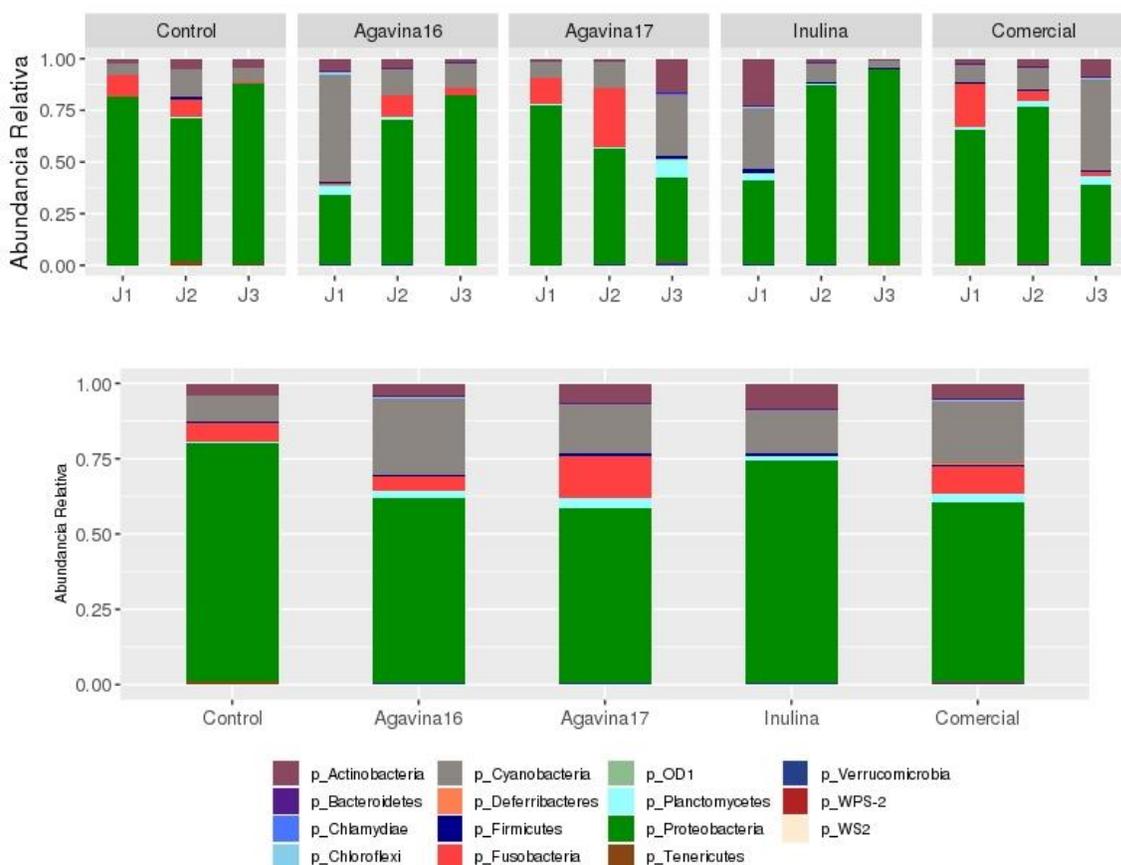


Figura 36. Perfil taxonómico a nivel de phylum en el hepatopáncreas.

En la Figura 37 se presenta el diagrama de Venn a nivel de phylum. Se destaca que los tratamientos con agavinas comparten el candidato a phylum OD1 estando en las tres muestras de agavina16 y solo en una de agavina17. Este candidato a phylum también referida como *Parcubacteria* no tiene representantes que hayan sido

aislados, ha sido identificadas como bacterias de ambientes anoxigénicos, de análisis genómicos se ha inferido que son de estilo de vida simbiótico con evidencia de metabolismo fermentativo anaerobio (Nelson & Stegen, 2015).

No hay un phylum compartido por los tres tratamientos con fructanos ni phylum únicos de alguno de los tratamientos. Los camarones que se alimentaron con el tratamiento control y con los diferentes fructanos comparten la fila *Chlamydiae* bacterias pertenecientes. Este phylum han sido asociadas con enfermedades en animales acuáticos (Stride et al., 2014); en el caso del camarón blanco este phylum ha sido reportado en camarones expuesto a estrés de amoniaco (Jiang et al., 2019) y en camarones moribundos en Ecuador se identificaron vesículas intracelulares asociados a organismos tipo clamidia (Jimenez et al., 2001).

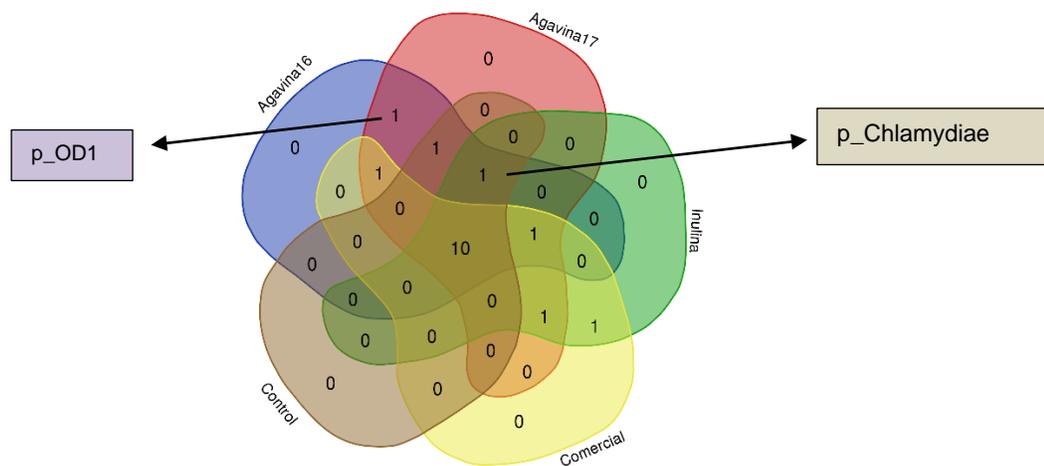


Figura 37. Diagrama de Venn a nivel de phylum en el hepatopáncreas

A nivel de género las bacterias más abundantes en el hepatopáncreas independientemente del tratamiento fueron: *Vibrio* (0.027-0.657), una bacteria perteneciente a la familia *Pseudoalteromonadaceae* sin asignarse a género (0.009-0.375), *Photobacterium* (0.001-0.455), género sin asignar perteneciente al orden de *Stramenopiles* (0.019-0.103), *Synechococcus* (0.017-0.236) seguido de una bacteria sin asignar perteneciente a la familia *Rhodobacteraceae* y bacterias del género *Propionigenium*. Sin embargo, a diferencia del nivel de phylum, se aprecia más variación en los géneros de bacterias entre los tratamientos.

Se destaca que el tratamiento con inulina al igual que en el intestino, disminuye la abundancia de *Photobacterium* y *Propionigenium* que, en el resto de los tratamientos, se encuentran dentro de los diez géneros más abundantes ingresan dos bacterias pertenecientes a la fila *Actinobacteria* que en el caso del tratamiento con agavina16 *Photobacterium* es la bacteria más abundante (Figura 38 y

Tabla 12).

Tabla 12. Diez géneros más abundantes en el hepatopáncreas, entre paréntesis se presenta la abundancia relativa.

AGAVINA16	AGAVINA17	INULINA	COMERCIAL	CONTROL
g_Photobacterium (0.223)	f_Pseudoalteromonadaceae;g_ (0.179)	g__Vibrio (0.344)	g__Vibrio (0.148)	g__Vibrio (0.306)
o_Stramenopiles;f__;g__ (0.121)	g_Vibrio (0.174)	f__Pseudoalteromonadaceae ;g__ (0.207)	f__Pseudoalteromonadaceae;g__ (0.146)	g__Photobacterium (0.167)
g_Vibrio (0.111)	g_Propionigenium (0.128)	o__Stramenopiles;f__;g__ (0.057)	g__Synechococcus (0.098)	f__Pseudoalteromonadaceae ;g__ (0.164)
f_Pseudoalteromonadaceae;g_ _ (0.092)	f_Pseudoalteromonadaceae;Other (0.087)	f__Enterobacteriaceae;g__ (0.055)	f__Rhodobacteraceae;g__ (0.091)	f__Pseudoalteromonadaceae ;Other (0.053)
f_Rhodobacteraceae;g_ (0.083)	g_Synechococcus (0.062)	g__Synechococcus (0.043)	g__Propionigenium (0.075)	g__Propionigenium (0.035)
g_Synechococcus (0.061)	f__Rhodobacteraceae;g__ (0.051)	f__Rhodobacteraceae;g__ (0.040)	f__Pseudoalteromonadaceae;Other (0.074)	o__Stramenopiles;f__;g__ (0.034)
o_Chlorophyta;f__;g_ (0.041)	o__Stramenopiles;f__;g__ (0.051)	f__Microbacteriaceae;g__ (0.035)	o__Chlorophyta;f__;g__ (0.046)	g__Synechococcus (0.029)
g_Propionigenium (0.040)	g__Photobacterium (0.050)	o__Actinomycetales;f__;g__ (0.034)	o__Stramenopiles;f__;g__ (0.044)	o__Fusobacteriales;f__;g__ (0.024)
f_Enterobacteriaceae;g_ (0.022)	o__Actinomycetales;f__;g_ _ (0.038)	f__Pseudoalteromonadaceae ;Other (0.031)	g__Photobacterium (0.039)	f__Enterobacteriaceae;g__ (0.021)
f_Pseudoalteromonadaceae;O ther (0.017)	f__Pirellulaceae;g__ (0.033)	f__Pirellulaceae;g__ (0.014)	f__Pirellulaceae;g__ (0.026)	f__Rhodobacteraceae;g__ (0.018)

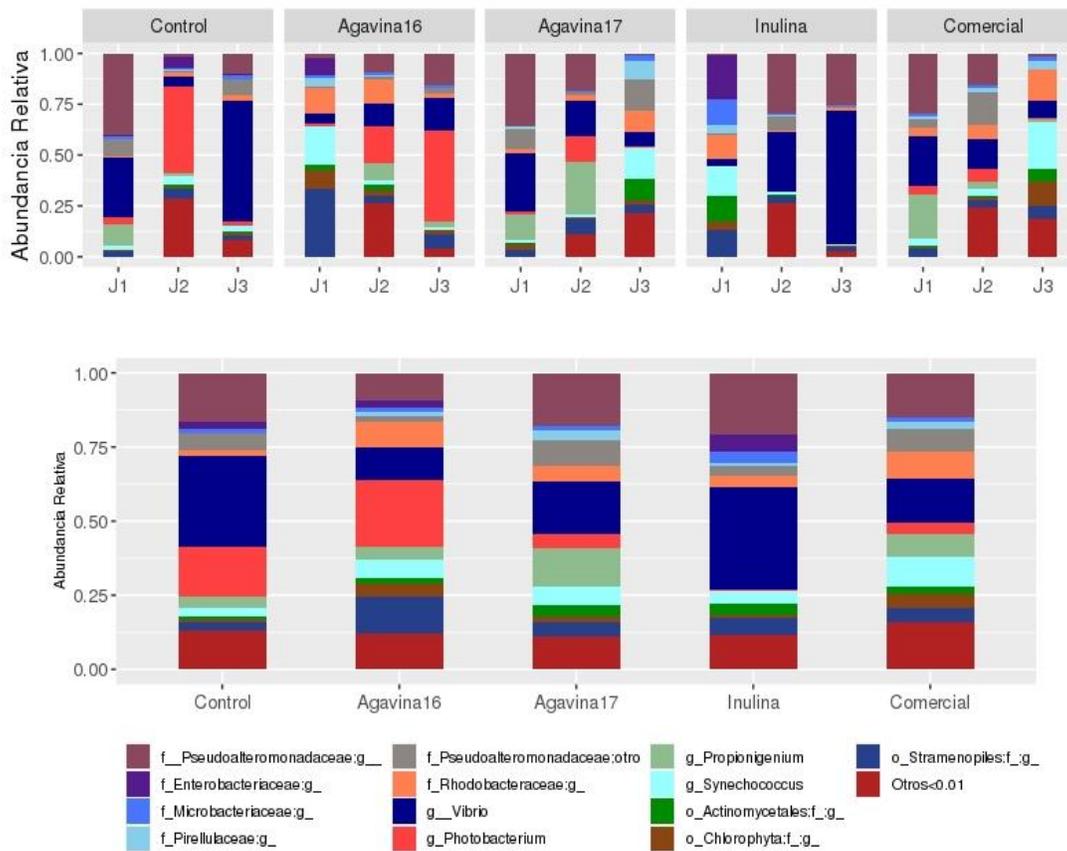


Figura 38. Perfil taxonómico a nivel de género en el hepatopáncreas

Al realizar el diagrama de Venn (Figura 39) a nivel de género encontramos que los camarones alimentados con los tratamientos con agavinas comparten bacterias que no se llegan a asignar a género pertenecientes a la familia *Clostridiaceae* y el candidato a phylum *OD1*.

Las muestras del tratamiento inulina y el tratamiento de agavina17 comparten un género perteneciente a la familia de *Simkaniaceae*. Esta familia se ha identificado como agente problemático en el cultivo de salmón ya que genera epitelocistis en piel y branquias (Blandford et al., 2018), sin embargo, no hay reportes de que afecte al cultivo del camarón blanco del Pacífico.

De los tratamientos con fructanos el tratamiento con inulina y agavina17 son los únicos en presentar géneros únicos. El tratamiento con inulina presenta dos géneros únicos en el que se destaca una bacteria perteneciente a la familia *Nocardiopsaceae* que es también única para este mismo tratamiento en el intestino. Esta familia al pertenecer al phylum *Actinobacteria*, podría ser de potencial probiótico, ya que como se expuso anteriormente este phylum cuenta con especies que producen antibióticos como metabolitos secundarios y se ha encontrado más abundante en camarones sanos con respecto a enfermos. Finalmente, el tratamiento con agavina17 posee dos géneros únicos de bacteria, *Odoribacter* y *Helicobacter*.

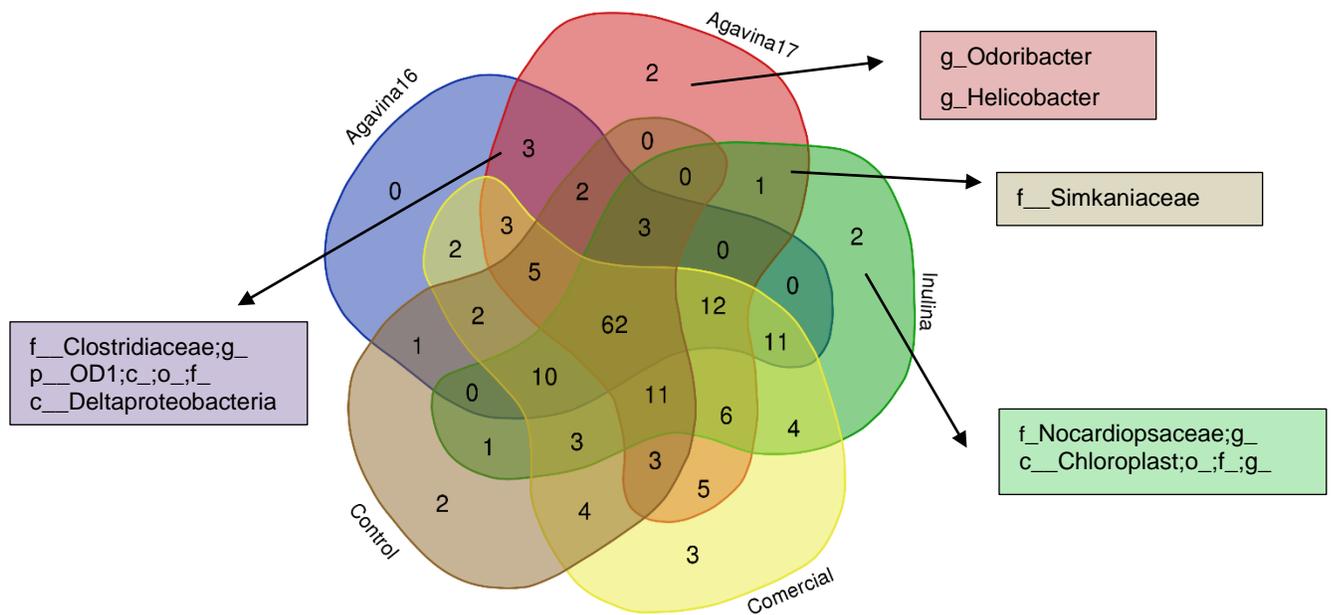


Figura 39. Diagrama de Venn a nivel de género del hepatopáncreas.

Para cerrar esta sección del perfil taxonómico se presenta a manera de resumen lo que se propone como lo más relevante del efecto del uso de fructanos en la microbiota.

Tabla 13. Tabla resumen del uso de fructanos en el perfil taxonómico de la microbiota en el intestino y hepatopáncreas.

Taxón	Órgano	Tratamiento	Característica
<i>p_OD1</i>	Hepatopancreas	Agavina16 y Agavina17	Candidata a phylum, bacterias anoxigénicas con evidencia de metabolismo fermentativo anaerobio que posiblemente se ve beneficiada por el uso de agavina.
<i>g_Lactobacillus</i>	Intestino	Agavina17	Bacteria probiótica.
<i>g_Enterobacter</i>	Intestino	Agavina17	Bacteria reportada con potencial probiótico.
<i>f_Nocardiopsaceae;</i> <i>g_</i>	Intestino y Hepatopancreas	Inulina	Familia perteneciente al phylum <i>Actinobacteria</i> que posiblemente se ve beneficiada ya sea por el consumo directo de inulina (fructano línea) o por los productos del consumo de la misma por el resto de la microbiota.
<i>Micrococcaceae</i>	Intestino	Agavina16 y Agavina17	Familia perteneciente a la fila <i>Actinobacteria</i> por lo que podría ser potencial probiótico.
<i>Photobacterium</i>	Intestino y Hepatopáncreas	Inulina	Bacteria patógena oportunista. Disminuyó su abundancia en ambos órganos por el uso de inulina.

6.6.1. Abundancias diferenciales entre tratamientos (Lefse)

Se buscaron bacterias diferencialmente abundantes entre tratamientos, empleando Lefse, usando la tabla biom filtrada y rarefaccionada previamente, tomando como significativos valores de p-valor<0.05 y un punto de corte de LDA de 1.5.

6.6.1.1 Identificación de bacterias diferencialmente abundantes en el intestino

La Figura 40 muestra el LDA de las bacterias diferencialmente abundantes para cada prebiótico comparándolo con respecto al control.

El tratamiento con Agavina2016 aumenta la abundancia del género *Arthrobacter*. Este género ha sido empleado previamente como probiótico de camarón blanco del Pacífico en las tres concentraciones probadas, favorecieron la supervivencia y aumento la respuesta inmune (Xia, Zhu et al., 2014). Por lo que la presencia de este género más abundante en los camarones alimentados con Agavina2016 podría tener efecto probiótico.

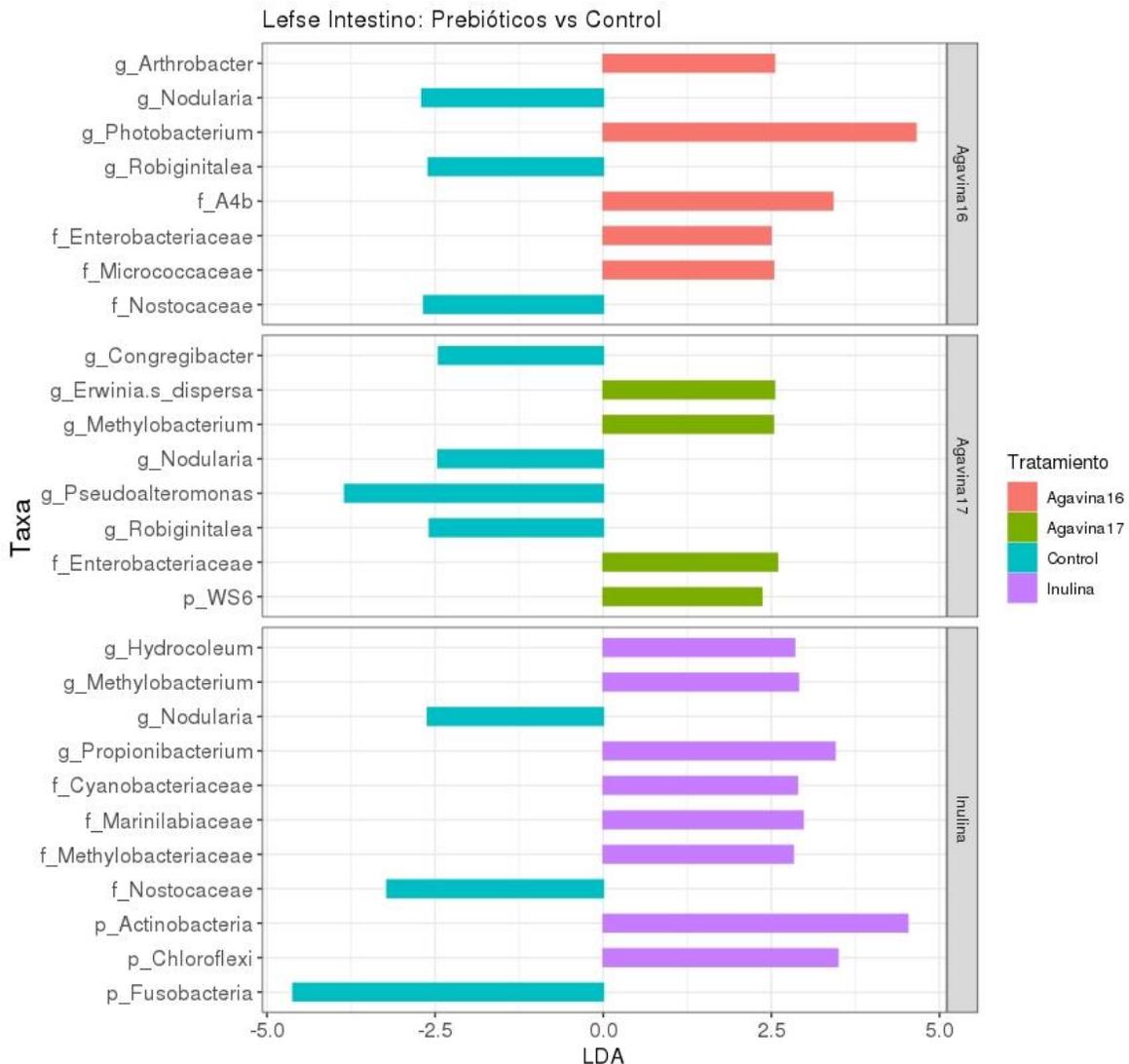


Figura 40. LDA de las bacterias diferenciales en el intestino con respecto al control.

Adicionalmente a *Arthrobacter* el tratamiento de Agavina16 aumenta significativamente la abundancia de bacterias pertenecientes al género *Photobacterium*. Este género forma parte de la microbiota habitual en el intestino del camarón blanco del Pacífico, sin embargo, ha sido identificado como patógeno oportunista en el camarón. J. Xiong en 2017 describen que bacterias del género *Photobacterium* reprime candidatos a patógenos pertenecientes al género de *Vibrio*, mientras que una vez desarrollada la enfermedad cambia a sinergia en camarones enfermos (Xiong et al., 2017).

Por su parte el tratamiento con Agavina17 aumenta la abundancia en la microbiota intestinal del camarón de bacterias pertenecientes al género *Erwinia*, mientras que disminuye la abundancia de *Pseudoalteromonas*.

La microbiota de los camarones alimentados con inulina se disminuye la abundancia del phylum *Fusobacteria* que como se mencionó anteriormente se encuentra más abundante en camarones cultivados en granja con respecto a camarones crecidos en instalaciones techadas (Landsman et al., n.d.). Por otro lado, la abundancia de los phylum *Chloroflexi* y *Actinobacteria* se vieron aumentadas en el intestino de los camarones alimentados con inulina. El phylum *Chloroflexi* ya ha sido reportada previamente como parte de la microbiota de *P. vannamei* (Fan & Li, 2019; Zeng et al., 2017). Mientras que el phylum *Actinobacteria* se ha reportado más abundante en camarones sanos con respecto a camarones enfermos y que esto podría representar una ventaja ya que especies de esta fila pueden proveer de antibióticos al hospedero otorgándole el beneficio de resistir el establecimiento de patógenos (Dai et al., 2018)

Ambos tratamientos con agavina16 y 17 disminuyen la abundancia del género *Robiginitalea* con respecto al control. Este generó, pertenece a la familia *Flavobacteriaceae* y ha sido reportada dentro de la microbiota del camarón blanco del Pacífico (Zeng et al., 2017). El género *Methylobacterium* resalta ya que se encuentra diferencialmente más abundante en los tratamientos con agavina17 e inulina con respecto al control, su principal aporte a la acuicultura es como fuente de proteína alternativa (Tlusty et al., 2017), sin embargo, no se ha asociado a la microbiota del camarón, pero si se ha asociado como bacteria simbiótica de agave (Cervantes-mart & López-d, 2004) y caña de azúcar (Avelino et al., 2018).

Vale la pena resaltar que el tratamiento control presenta más abundancia de bacterias del género *Nodularia* comparándola con cualquiera de los tres tratamientos con prebiótico. Esta cianobacteria es considerada dañina debido a la producción de una hepatotoxina que inhibe la fosfatasa 1 y 2A. Si bien ha sido asociada con envenamamiento de animales domesticados como perros y ovejas, En Brasil, *Nodularia* ha sido observada en diferentes ciclos de producción del camarón

blanco del Pacífico, reduciendo la supervivencia y el performance de crecimiento (Popin et al., 2020).

6.6.1.2 Identificación de bacterias diferencialmente abundantes debida a la diferentes estructuras de los fructanos en el intestino

La Figura 41 presenta la comparación entre fructanos en el intestino. El tratamiento con inulina disminuye la abundancia del phylum *Fusobacteria*, la familia *Fusobacteriaceae* y el género *Porpionigenium* y *Photobacterium* siendo estos cambios constantes comparándolo con los dos tratamientos de agavina. Esto podría estar asociado a estructuras lineales de alto peso molecular.

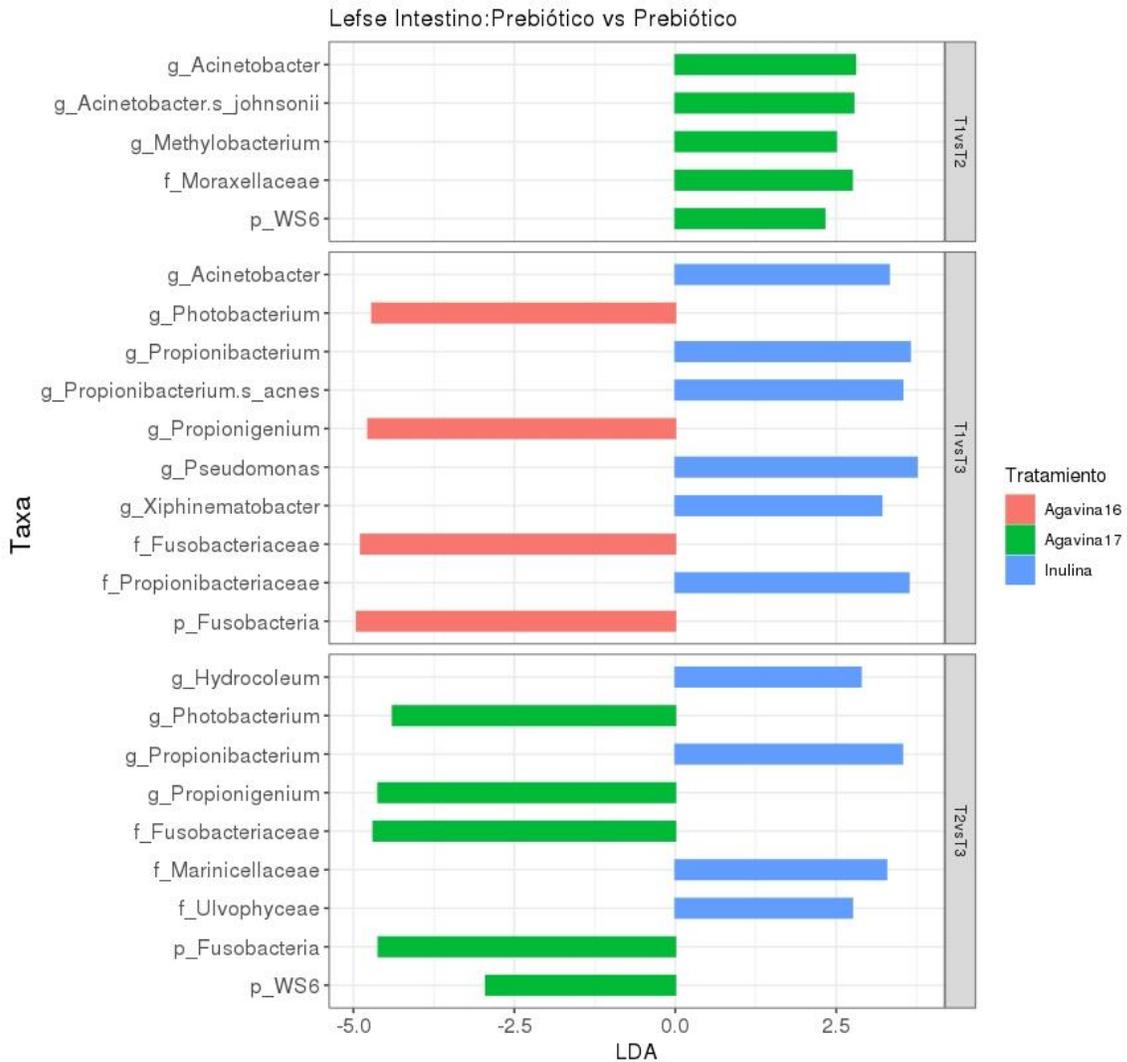


Figura 41. LDA comparación entre fructanos en el intestino.

Mientras que el tratamiento agavina17 aumenta la abundancia del clado WS6. Este clado es candidato a phylum Dojkabacteria se cuenta con limitada información de este candidato a phylum, pero fue encontrado en sedimentos del rio colorado (Wrighton et al., 2016).

6.6.1.3 Identificación de bacterias diferencialmente abundantes en el hepatopáncreas

En la Figura 42, se presentan los taxa diferencialmente abundantes en el hepatopáncreas comparando los tratamientos con prebióticos versus el tratamiento control.

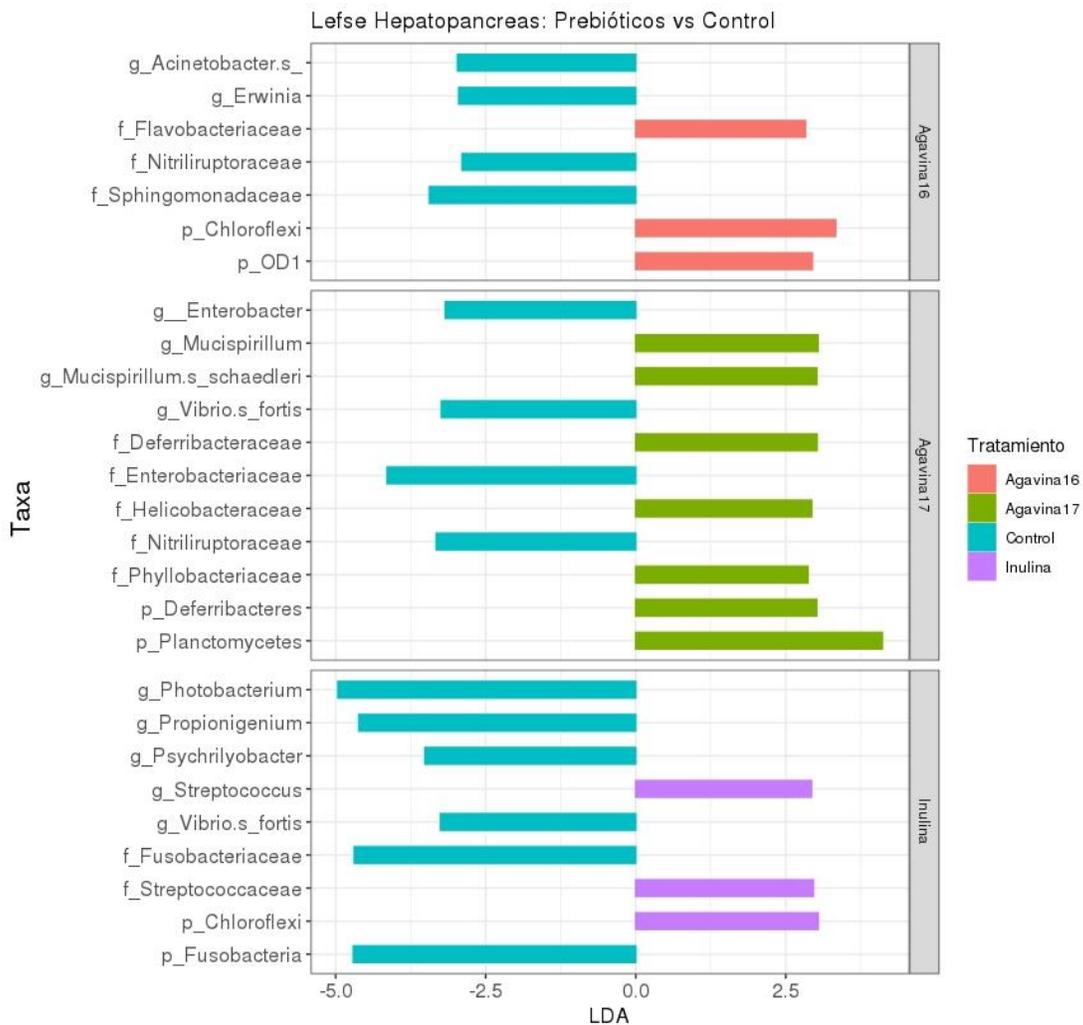


Figura 42. LDA de las bacterias diferenciales en el hepatopáncreas con respecto al control.

En estas comparaciones se destaca lo siguiente:

El tratamiento con inulina, disminuye significativamente del phylum *Fusobacteria*, la familia *Fusobacteriaceae* y el género *Propionigenium*. El phylum *Fusobacteria* consiste solo de una clase *Fusobacteriia* y un orden *Fusobacteriales* dos familias *Fusobacteriaceae* y *Leptotrichiaceae* englobando 9 géneros de bacterias (Gupta et al, 2014). En este trabajo encontramos diferencialmente menos abundante el género *Propionigenium*, el cual consiste de dos especies *P. modestum* y *P. maris* que son bacterias son Gram-negativo, anaerobio estricto, capaz de crecer empleando succinato como fuente de carbono; descarboxilándolo para generar propionato como producto de la fermentación (Schink, 2006). Adicionalmente camarones alimentados con este mismo tratamiento presentaron una disminución significativa de la abundancia de bacterias del género *Photobacterium*, este género pertenece a la fila *Proteobacteria*; siendo este un resultado relevante ya que esta bacteria es patógena oportunista y se reportó más abundante en el hepatopáncreas de camarones enfermos (Cornejo-Granados et al., 2017) y específicamente *Photobacterium damsela* se identificó como causante de mionecrosis y necrosis en el hepatopáncreas del camarón blanco del Pacífico (Singaravel, 2020). Finalmente aumenta la abundancia del género *Streptococcus* que ha sido estudiada previamente como probiótico de camarón.

Por otro lado, el tratamiento con agavina¹⁷ disminuye la abundancia de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Enterobacter*, mientras que aumenta la abundancia del género *Mucispirillum*. *Mucispirillum* es una bacteria anaerobia, móvil y no formadora de espora que ha sido detecta en diferentes hospederos como puercos, cabras, perros, termitas, cucarachas, ratones e incluso humanos y se destaca por que coloniza en la mucosa intestinal. Se reportó que esta bacteria protege de la infección de *Salmonella typhimurium* en ratones mutantes que carecían de la capa interna de la mucosa intestinal (Herp et al., 2019). Por lo que esta bacteria podría tener potencial prebiótico en el camarón.

Asimismo los camarones alimentados con agavina16 aumenta la abundancia de la fila OP1 que se identificó como única para los tratamientos con agavinas, estando presente para las tres muestras del tratamiento con este fructano.

De manera compartida el tratamiento con inulina y agavina16 aumentaron significativamente la abundancia de la fila *Chloroflexi*, que como se mencionó previamente ha sido reportada como parte de la microbiota del camarón blanco del Pacífico. Mientras que la inulina y el tratamiento con agavina17 disminuyeron la abundancia de *Vibrio fortis*, bacterias del género *Vibrio* que son ubicuas en el medio marino, forman parte de la microbiota del camarón blanco del Pacífico. Sin embargo especies de este género están implicadas como causantes de enfermedades en el camarón.

6.6.1.4 Identificación de bacterias diferencialmente abundantes debida a la diferentes estructuras de los en el hepatopancreas

Finalmente se hizo la búsqueda de bacterias diferencialmente abundantes haciendo la comparación entre los tratamientos con fructanos (agavina16 vs agavina17, agavina16 vs inulina y agavina17 vs inulina) Figura 43.

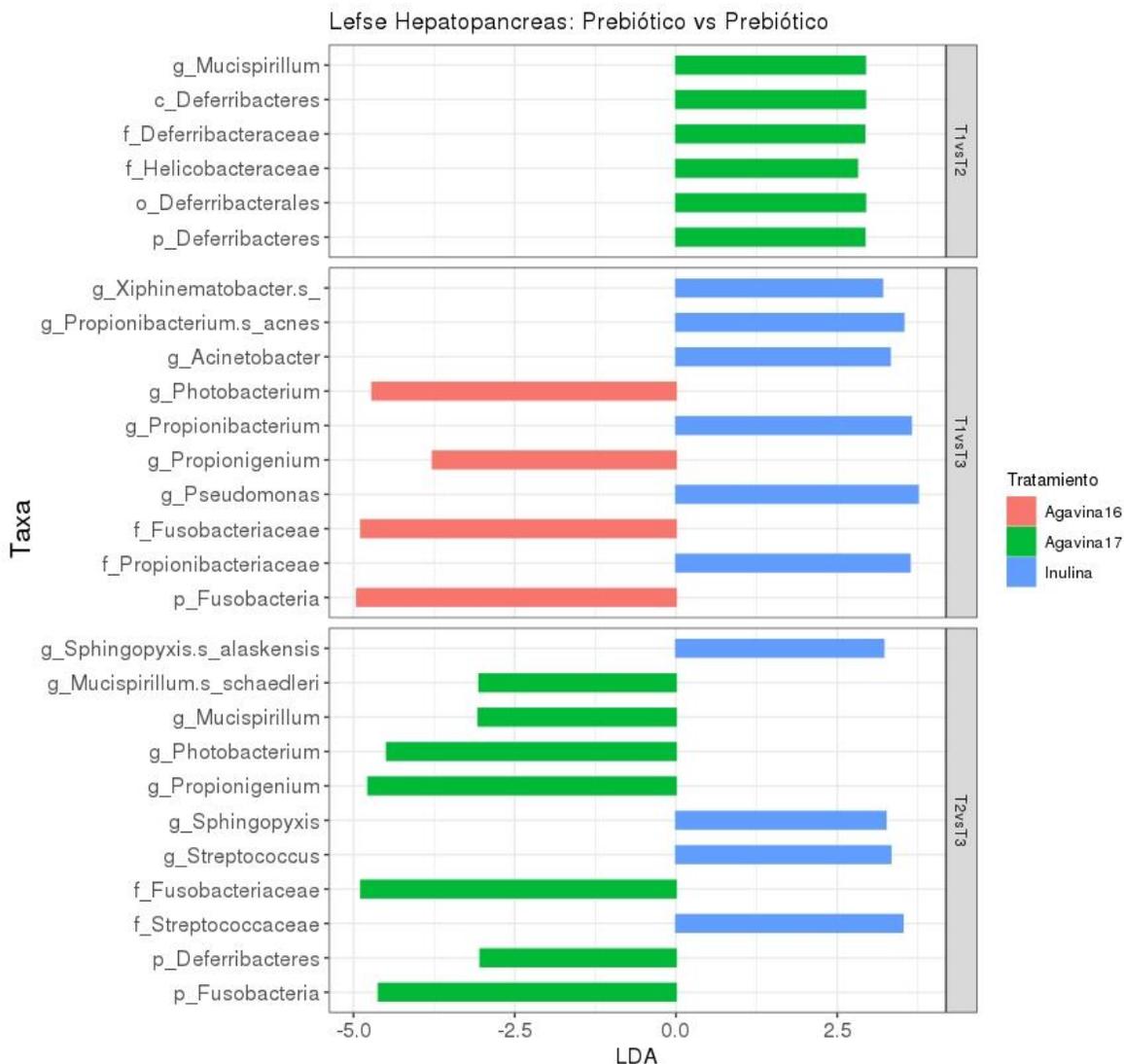


Figura 43. LDA comparación entre las diferentes estructuras fructanas en el hepatopáncreas.

El tratamiento con agavina17 aumenta la abundancia de bacterias del género *Mucispirillum* con respecto a los demás tratamientos con fructanos, esto podría estar asociado a estructuras ramificadas de bajo peso molecular ya que además como se mostró previamente (Figura 42) este aumento también se observa al compararlo con el control.

El tratamiento con inulina disminuye la abundancia de *Propionigenium* comparándolo con ambos tratamientos con agavina. Adicionalmente aumenta la abundancia de *Streptococcus* con respecto al tratamiento con agavina17, el

aumento de bacterias del género *Streptococcus* debido a la inulina también se observa comparándola con respecto al control. Ambos cambios en la microbiota podrían deberse a estructuras lineales de alto peso molecular de fructanos como las encontradas en la inulina empleada en este bioensayo.

Bacterias del género *Streptococcus* como son *S. thermophilus* (de Souza Oliveira, et al., 2012) y *S. bovis* (Harlow et al, 2017) se han descrito que crecen en presencia de inulina. Si bien en el reporte de *S. thermophilus* no especifican el grado de polimerización de la inulina empleada, describen que crece mejor en presencia de inulina que en ausencia de ella; mientras que en el reporte de *S. bovis* si evalúan diferentes grados de polimerización de la inulina y encuentran que crece mejor en inulina con grado de polimerización de 1 a 13 que en inulina con grado de polimerización de 13 a 60. De los fructanos empleados la inulina era el de mayor peso molecular (4251.41 g/mol) mientras que la agavina¹⁷ era el fructano de menor peso molecular (2759.08 g/mol) por lo que sugiere que bacterias del género *Streptococcus* en el camarón estén consumiendo la inulina de alto peso molecular o que se estén aprovechando del consumo de las cadenas cortas de inulina que podrían ser el producto de la degradación de las cadenas largas de inulina por otras bacterias de la microbiota.

7. Perspectivas y limitantes de este trabajo

El presente trabajo aporta la evaluación del efecto de agavina como suplemento en la dieta del camarón blanco en la microbiota intestinal empleando tecnología de secuenciación masiva para describirla. Adicionalmente presenta el estudio de la microbiota del hepatopáncreas ya que este órgano cuenta con muy pocos estudios que la caractericen y/o que evalúen el efecto de una intervención dietaria en la microbiota de dicho órgano.

La principal limitante de este estudio es el tamaño de muestra por tratamiento. Seguido de que se asignaron muy pocas secuencias perdiendo mucha información.

Como perspectivas de este trabajo sería evaluar otra base de datos para ver si mejora la recuperación de información al elevar el número de secuencias asignadas.

Aumentar la n del estudio secuenciando en vez de mezclas de ADN por tratamiento las muestras individuales.

Ya que se ha demostrado que los prebioticos poseen actividad inmunoestimulante se podria analizar la expresi3n diferencial v3a PCR en tiempo real evaluando la expresi3n de genes involucrados en la inmunidad del camar3n.

8. Conclusiones

- El uso de prebi3ticos no representa alg3n beneficio en su crecimiento del camar3n blanco del Pac3fico.
- Se observ3 que el principal factor que moldea la microbiota del tracto gastrointestinal en el camar3n es el 3rgano, siendo el intestino m3s rico y diverso que el hepatop3ncreas.
- La microbiota del hepatop3ncreas pareciera ser m3s susceptible a ser moldeada por una intervenci3n dietaria con fructanos que la del intestino. Encontr3ndose diferencia significativa entre los tratamientos en la diversidad beta del hepatop3ncreas.
- Los tres tratamientos con prebi3tico disminuyeron la abundancia de *Nodularia*, cuyos florecimientos en estanques de producci3n del camar3n blanco del Pac3fico han afectado su producci3n, sugiriendo el potencial ben3fico de los prebi3ticos para disminuir esta bacteria nociva en el cultivo del camar3n.
- De los tratamientos con prebi3tico, el tratamiento con inulina mostro ser m3s efectivo generando cambios en la microbiota, ya que disminuy3 la abundancia de *Propionigenium* tanto en el intestino como en el hepatop3ncreas, disminuyo significativamente la abundancia de *Photobacterium* en el hepatop3ncreas un pat3geno oportunista del camar3n blanco del Pac3fico y aumento la abundancia de *Streptococcus* estudiado previamente como probi3tico en el camar3n
- . Adicionalmente los camarones tratados con inulina presentaron bacterias 3nicas en ambos 3rganos pertenecientes a la familia *Nocardiopsaceae* que podr3a ser de potencial probi3tico.

- En los camarones tratados con agavina¹⁷ se encontró a *Lactobacillus* y *Enterobacter*, bacterias reportadas previamente como probióticos en el intestino, sin ser su abundancia estadísticamente significativa. De manera significativa aumentó la abundancia de *Mucispirillum* que podría brindar efecto protector en el camarón.

9. Referencias

- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, *45*(2), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>
- Aronesty, E. (2013). Comparison of Sequencing Utility Programs. *The Open Bioinformatics Journal*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.2174/1875036201307010001>
- Avelino, P., Andrade, M. De, Cavalcante, A., Dias, F., & Raposo, S. (2018). Differential niche occupation and the biotechnological potential of *Methylobacterium* species associated with sugarcane plants, (July). <https://doi.org/10.5897/ajmr2018.8905>
- Ayisi, C. L., Hua, X., Apraku, A., Afriyie, G., & Kyei, B. A. (2017). Recent Studies Toward the Development of Practical Diets for Shrimp and Their Nutritional Requirements. *HAYATI Journal of Biosciences*, *24*(3), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.09.004>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... Knight, R. (2010). correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Publishing Group*, *7*(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Cervantes-mart, J., & López-d, S. (2004). Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var . azul by laser-induced fluorescence, *166*, 889–892. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.029>
- Cock, J., Gitterle, T., Salazar, M., & Rye, M. (2009). Breeding for disease resistance of Penaeid shrimps. *Aquaculture*, *286*(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.011>
- 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*, *2018*(8).

<https://doi.org/10.7717/peerj.5382>

- 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), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11805-w>
- Dai, W., Yu, W., Xuan, L., Tao, Z., & Xiong, J. (2018). Integrating molecular and ecological approaches to identify potential polymicrobial pathogens over a shrimp disease progression, 3755–3764.
- de Souza Oliveira, R. P., Perego, P., de Oliveira, M. N., & Converti, A. (2012). Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.031>
- Fan, L., & Li, Q. X. (2019). Characteristics of intestinal microbiota in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* differing growth performances in the marine cultured environment. *Aquaculture*, 505(March), 450–461. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.075>
- Fan, L., Wang, Z., Chen, M., Qu, Y., Li, J., Zhou, A., ... Zou, J. (2019). Science of the Total Environment Microbiota comparison of Pacific white shrimp intestine and sediment at freshwater and marine cultured environment. *Science of the Total Environment*, 657, 1194–1204. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.069>
- Fenucci Jorge. (1988). *Manual para la cria de camarones peneidos*. *Fao.org*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/ca9231es/CA9231ES.pdf>
- Flegel, T. W., Lightner, D. V., Lo, C. H. U. F., & Owens, L. (2008). Shrimp Disease Control : Past , Present and Future. *Diseases in Asian Aquaculture VI*, 355–378.
- Gainza, O., Ramírez, C., Ramos, A. S., & Romero, J. (2018). Intestinal Microbiota of White Shrimp *Penaeus vannamei* Under Intensive Cultivation Conditions in Ecuador. *Microbial Ecology*, 75(3), 562–568. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1066-z>
- 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). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010134>
- Gibson, G. L. E. Y. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Critical Review Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics, (August 1994).
- González-félix, M. L., Gatlin, D. M., Urquidez-bejarano, P., Reé-rodríguez, C. De, Duarte-rodríguez, L., Sánchez, F., ... Perez-velazquez, M. (2018). E ff ects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth , innate immune responses , and intestinal microbiota and histology of Totoaba macdonaldi. *Aquaculture*, 491(August 2017), 239–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.031>
- Gupta, R. S., & Sethi, M. (2014). Phylogeny and molecular signatures for the phylum Fusobacteria and its distinct subclades. *Anaerobe*, 28, 182–198. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.06.007>
- Guzmán-Villanueva, L. T., Escobedo-Fregoso, C., Barajas-Sandoval, D. R., Gomez-Gil, B., Peña-Rodríguez, A., Martínez-Díaz, S. F., ... Quiroz-Guzmán, E. (2020). Assessment of microbial dynamics and antioxidant enzyme gene expression following probiotic administration in farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 519(August 2019), 734907. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734907>
- Harlow, B. E., Kagan, I. A., Lawrence, L. M., & Flythe, M. D. (2017). Effects of Inulin Chain Length on Fermentation by Equine Fecal Bacteria and *Streptococcus bovis*. *Journal of Equine Veterinary Science*, 48, 113-120.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.11.010>
- Hasan, M. T., Je Jang, W., Lee, J. M., Lee, B. J., Hur, S. W., Gu Lim, S., ... Kong, I. S. (2019). Effects of Immunostimulants, Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, and Potentially Immunoreactive Feed Additives on Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*): A Review. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 27(4), 417–437. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1622510>
- Herp, S., Brugiroux, S., Garzetti, D., Ring, D., Jochum, L. M., Beutler, M., ... Stecher, B. (2019). *Mucispirillum schaedleri* Antagonizes Salmonella Virulence to Protect Mice against Colitis. *Cell Host and Microbe*, 25(5), 681-694.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.004>

- Hou, D. (2018). Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine , surrounding water and sediment. <https://doi.org/10.1111/jam.13919>
- Hou, Dongwei, 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8855-2>
- Hu, X., Yang, H. L., Yan, Y. Y., Zhang, C. X., Ye, J. dan, Lu, K. Le, ... 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*, 25(1), 194–204. <https://doi.org/10.1111/anu.12843>
- Huang, F., Pan, L., Song, M., Tian, C., & Gao, S. (2018). Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(19), 8585–8598. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9229-5>
- Huynh, T. G., Shiu, Y. L., Nguyen, T. P., Truong, Q. P., Chen, J. C., & Liu, C. H. (2017). Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 64, 367–382. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.035>
- Isabel, M., Alyce, B., Schlacher, T. T. A., Nowak, B., & Polkinghorne, A. (2018). Epitheliocystis in fish : An emerging aquaculture disease with a global impact, (April), 1–11. <https://doi.org/10.1111/tbed.12908>
- J., B.-R., & M., T.-G. (2004). La camaronicultura en México, (September).
- Jari Oksanen, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, P., Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. S., & Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, E. S. and H. W. (2020). No Title.
- Jiang, L., Feng, J., Ying, R., Yin, F., Pei, S., Lu, J., ... Li, Z. (2019). Fish and Shell fi sh Immunology Individual and combined e f f ects of ammonia-N and sul fi de on the immune function and intestinal microbiota of Paci fi c white shrimp *Litopenaeus vannamei*, 92(June), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.020>
- Jimenez, R., Barniol, R., Barniol, L. De, & Machuca, M. (2001). A dual infection by infectious

cuticular epithelial necrosis virus and a Chlamydia -like organism in cultured *Litopenaeus vannamei* (Boone) in Ecuador, 875–883.

Jin Song, S., Woodhams, D. C., Martino, C., Allaband, C., Mu, A., Javorschi-Miller-Montgomery, S., ... Knight, R. (2019). Engineering the microbiome for animal health and conservation. *Experimental Biology and Medicine*, 244(6), 494–504. <https://doi.org/10.1177/1535370219830075>

Landsman, A., St-pierre, B., Rosales-leija, M., Brown, M., & Gibbons, W. (n.d.). Impact of Aquaculture Practices on Intestinal Bacterial Profiles of Pacific Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*, 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040093>

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), 1–19. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1440530>

Li, P., Burr, G. S., Gatlin, 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. <https://doi.org/10.1093/jn/137.12.2763>

Li, Y., Liu, H., Dai, X., Li, J., & Ding, F. (2018). Effects of dietary inulin and mannan oligosaccharide on immune related genes expression and disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 76(February), 78–92. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.034>

López-Téllez, N. A., Corbalá-Bermejo, J. A., Bustamante-Unzueta, M. L., Silva-Ledesma, L. P., Vidal-Martínez, V. M., & Rodríguez-Canul, R. (2019). History, impact, and status of infectious diseases of the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Bonne, 1831) cultivated in Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society*, (October), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jwas.12662>

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. <https://doi.org/10.1021/jf030383v>

- Luna-González, A., Almaraz-Salas, J. C., Fierro-Coronado, J. A., Flores-Miranda, M. del C., 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*, 362–363, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.022>
- Mancilla-Margalli y Lopéz. (2006). Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and Dasyliirion Species, 54(20), 7832–7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., Desantis, T. Z., Probst, A., ... Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME Journal*, 6(3), 610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>
- Mellado-Mojica, E., González de la Vara, L. E., & López, M. G. (2017). Fructan active enzymes (FAZY) activities and biosynthesis of fructooligosaccharides in the vacuoles of Agave tequilana Weber Blue variety plants of different age. *Planta*, 245(2), 265–281. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2602-7>
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., Van Der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 130, 405–419. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.026>
- Mohanty, R. K., Ambast, S. K., Panigrahi, P., & Mandal, K. G. (2018). Water quality suitability and water use indices: Useful management tools in coastal aquaculture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 485(October 2017), 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.048>
- Moreno-Vilet, L., Bostyn, S., Flores-Montaña, J. L., & Camacho-Ruiz, R. M. (2019). Comparative data of molecular weight distribution of agave fructans fractions using MALDI-ToF and HPLC-SEC. *Data in Brief*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103984>
- Mukherjee, A., & Ghosh, K. (2016). Antagonism against fish pathogens by cellular components and verification of probiotic properties in autochthonous bacteria isolated from the gut of an Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton), 2243–2255.

<https://doi.org/10.1111/are.12676>

Nelson, W. C., & Stegen, J. C. (2015). The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle, 6(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00713>

Partida-Arangure, B. O., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J. A., Flores-Miranda, C., & 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), 3366–3375. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1569>

Popin, R. V., Delbaje, E., De Abreu, V. A. C., Rigonato, J., Dörr, F. A., Pinto, E., ... Fiore, M. F. (2020). Genomic and metabolomic analyses of natural products in nodularia spumigena isolated from a shrimp culture pond. *Toxins*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/toxins12030141>

Qiao, F., Liu, Y. K., Sun, Y. H., Wang, X. D., Chen, K., Li, T. Y., ... Zhang, M. L. (2017). Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Nutrition*, 23(3), 444–452. <https://doi.org/10.1111/anu.12412>

Ramírez, N. B., Seiffert, W. Q., Vieira, F. do N., Pedreira Mouriño, J. L., Alves Jesus, G. F., Ferreira, G. S., & Andreatta, E. R. (2013). Dieta suplementada com prebiótico, probiótico e simbiótico no cultivo de camarões marinhos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 48(8), 913–919. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800015>

Ritsema, T., & Smeeckens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00034-7)

Schink, B. (2006). The Genus *Propionigenium*, 955–959.

Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Segata-LEfSe-gb-2011.

- Singaravel, V. (2020). Photobacterium damsela subsp . damsela associated with bacterial myonecrosis and hepatopancreatic necrosis in broodstock Pacific white leg shrimp , Litopenaeus vannamei (Boone , 1931).
- Snozzi, M. (2000). Microbiological Denitrification and Denitrifying. *Chinese Journal of Geochemistry*, 19(2).
- Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., & Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 40(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>
- Stride, M. C., Polkinghorne, A., & Nowak, B. F. (2014). Chlamydial infections of fish : Diverse pathogens and emerging causes of disease in aquaculture species. *Veterinary Microbiology*, 170(1–2), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.022>
- Tlusty, M., Rhyne, A., Szczebak, J. T., Bourque, B., Bowen, J. L., Burr, G., ... Feinberg, L. (2017). A transdisciplinary approach to the initial validation of a single cell protein as an alternative protein source for use in aquafeeds, 1–19. <https://doi.org/10.7717/peerj.3170>
- Valle-gough, R. E., Apodaca-hernández, J. E., Rodriguez-dorantes, M., & Arena-ortiz, M. L. (2018). Metatranscriptomic analysis from the Hepatopancreas of adult white leg shrimp (Litopenaeus vannamei), 51–62.
- van Hai, N., & Fotedar, R. (2010). A review of probiotics in shrimp aquaculture. *Journal of Applied Aquaculture*, 22(3), 251–266. <https://doi.org/10.1080/10454438.2010.500597>
- Vaseeharan, B., Sundararaj, S., Murugan, T., & Chen, J. C. (2007). Photobacterium damsela ssp. damsela associated with diseased black tiger shrimp Penaeus monodon Fabricius in India. *Letters in Applied Microbiology*, 45(1), 82–86. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02139.x>
- Wahlstr, A. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health, 1993, 255–266.
- Wang, H., Huang, J., Wang, P., & Li, T. (2020). Insights into the microbiota of larval and postlarval Pacific white shrimp (Penaeus vannamei) along early developmental stages: a case in pond level. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(6), 1517–1528.

<https://doi.org/10.1007/s00438-020-01717-2>

Wrighton, K. C., Castelle, C. J., Varaljay, V. A., Satagopan, S., Brown, C. T., Wilkins, M. J., ... Banfield, J. F. (2016). RubisCO of a nucleoside pathway known from Archaea is found in diverse uncultivated phyla in bacteria. *ISME Journal*, *10*(11), 2702–2714. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.53>

Xia, Z., Zhu, M., & Zhang, Y. (2014). Effects of the probiotic *Arthrobacter* sp. CW9 on the survival and immune status of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Letters in Applied Microbiology*, *58*(1), 60–64. <https://doi.org/10.1111/lam.12156>

Xiong, J., Dai, W., Zhu, J., Liu, K., Dong, C., & Qiu, Q. (2017). The Underlying Ecological Processes of Gut Microbiota Among Cohabiting Retarded, Overgrown and Normal Shrimp. *Microbial Ecology*, *73*(4), 988–999. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0910-x>

Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S., & He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ*, *2017*(11). <https://doi.org/10.7717/peerj.3986>

Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., & Xu, D. (2012). Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, *33*(4), 1027–1032. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.001>

Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., ... Li, E. (2014). Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, *434*, 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.008>

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*(December 2019), 734847. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734847>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00099.x>

Zuo, Z., Shang, B., Shao, Y., Li, W., & Sun, J. (2019). Fish and Shellfish Immunology Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth , immune , digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 86(November 2018), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.003>

10. ANEXO

10.1. Formulación alimentos empleados en el bioensayo.

Tabla S1. Formulación de alimentos.

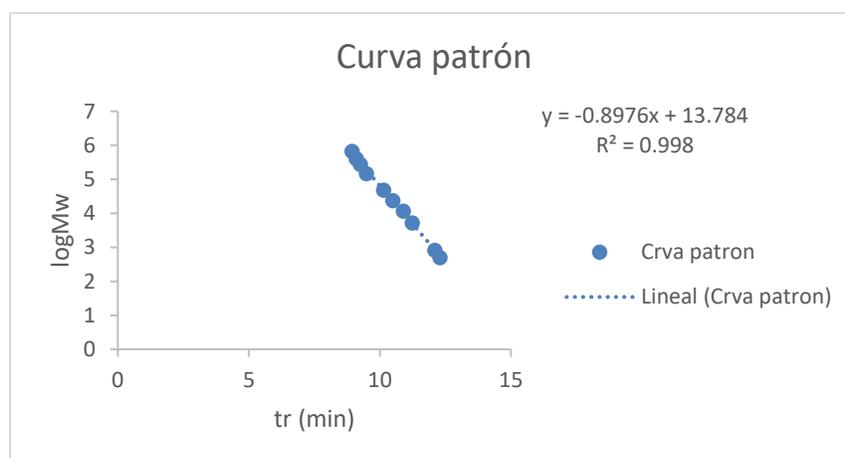
INGREDIENTES	Control	Agavina	Inulina
Harina de soya (g)	12	12	12
Harina de ave (g)	25	25	25
Harina de pescado (g)	14.4	14.4	14.4
Aceite de Pescado (g)	1.9	1.9	1.9
Almidón (g)	37.2	35.2	35.2
Aceite de soya (g)	2.2	2.2	2.2
Gelatina (g)	6	6	6
rovimix (mezcla vit y min) (g)	1	1	1
stay c (g)	0.07	0.07	0.07
INULINA (g)	0	0	2
AGAVINA (g)	0	2	0
benzoato de sodio (g)	0.25	0.25	0.25
BHT (g)	0.01	0.01	0.01

Formulación para preparar 100 g de alimento.

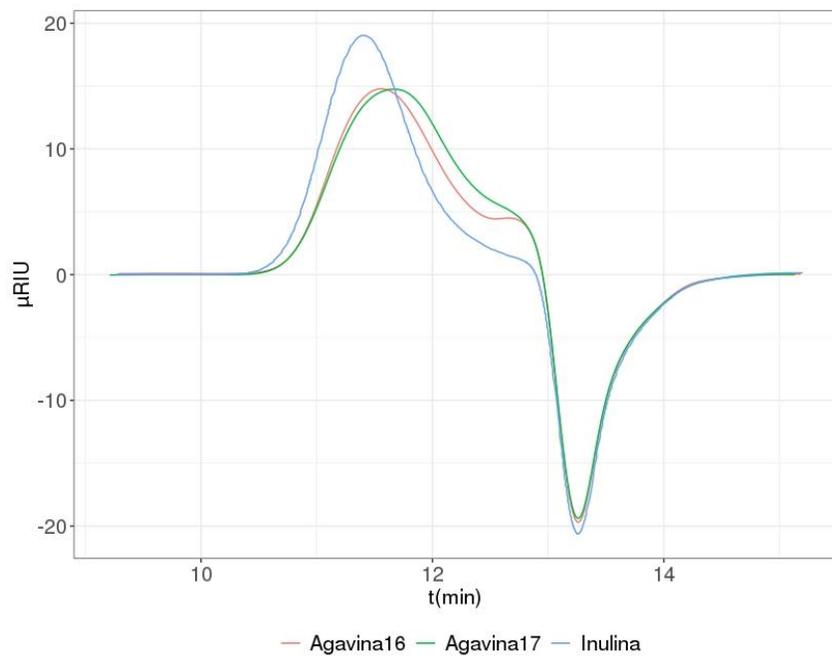
10.2. Cromatografía de exclusión de tamaño.

TablaS2. Tiempos de retención y peso molecular estándares de la curva patrón.

Mw estándares (g/mol)	Tiempo de retención (min)
242.3 Sacarosa	12.51
504.4 1-Kestosa	12.30
828.7	12.10
5,200	11.24
11,600	10.90
23,800	10.50
48,600	10.15
148,000	9.49
273,000	9.26
410,000	9.10
668,000	8.94



FiguraS1. Curva patrón cromatografía de exclusión de tamaño.



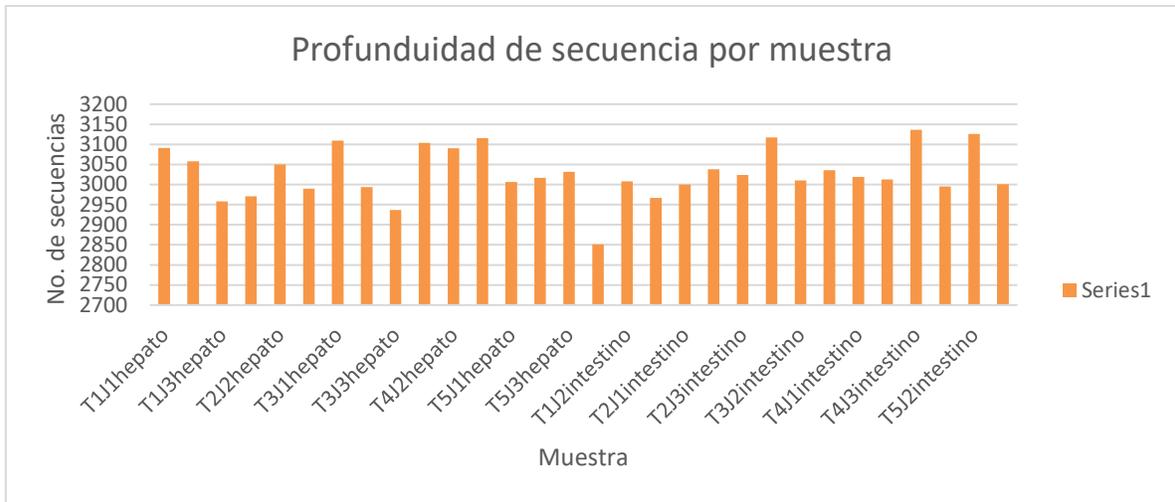
FiguraS2. Cromatograma de exclusión molecular.

10.3. Análisis bioinformático

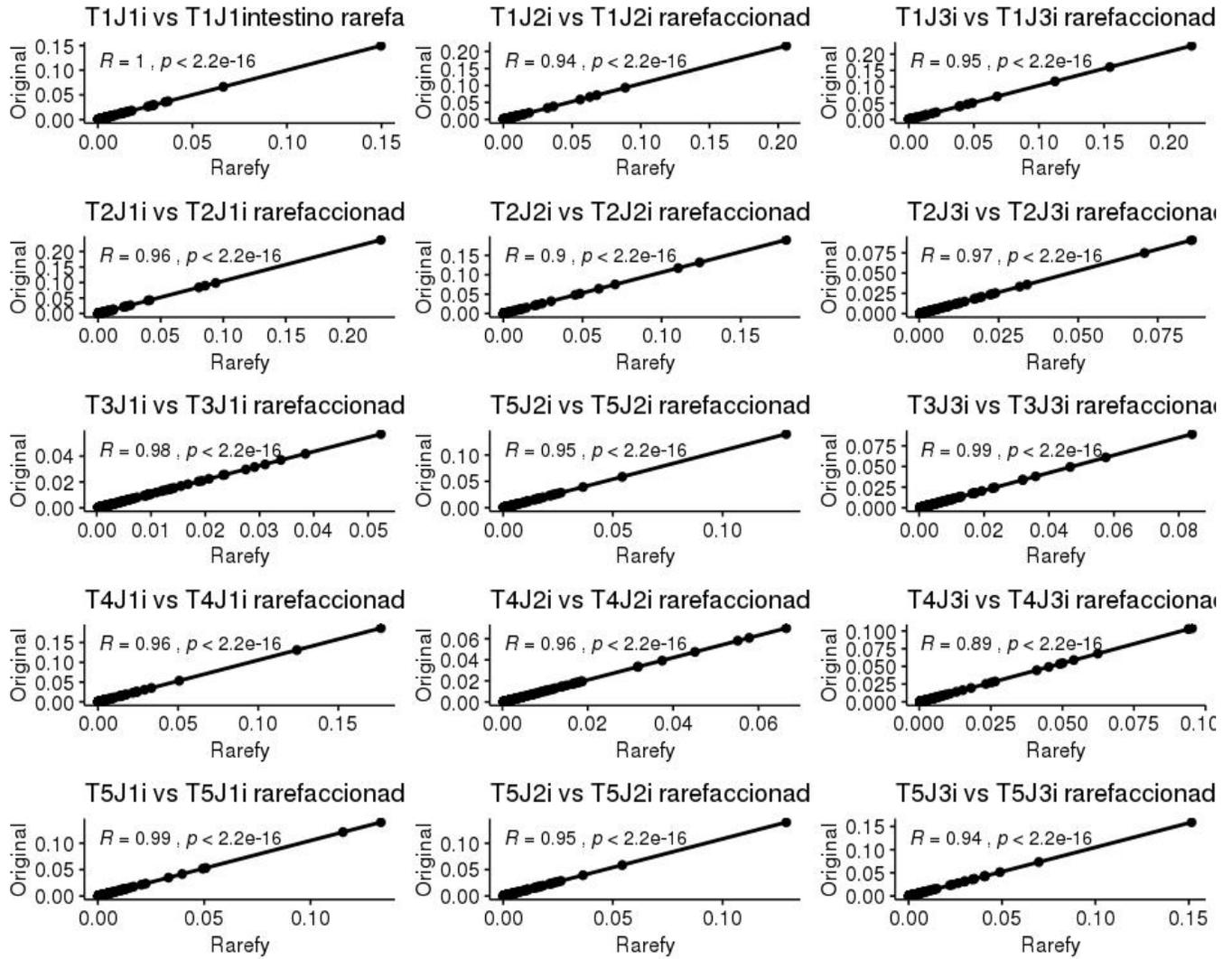
A continuación se presentan las librerías con su profundidad original y la profundidad después de la rarefacción.



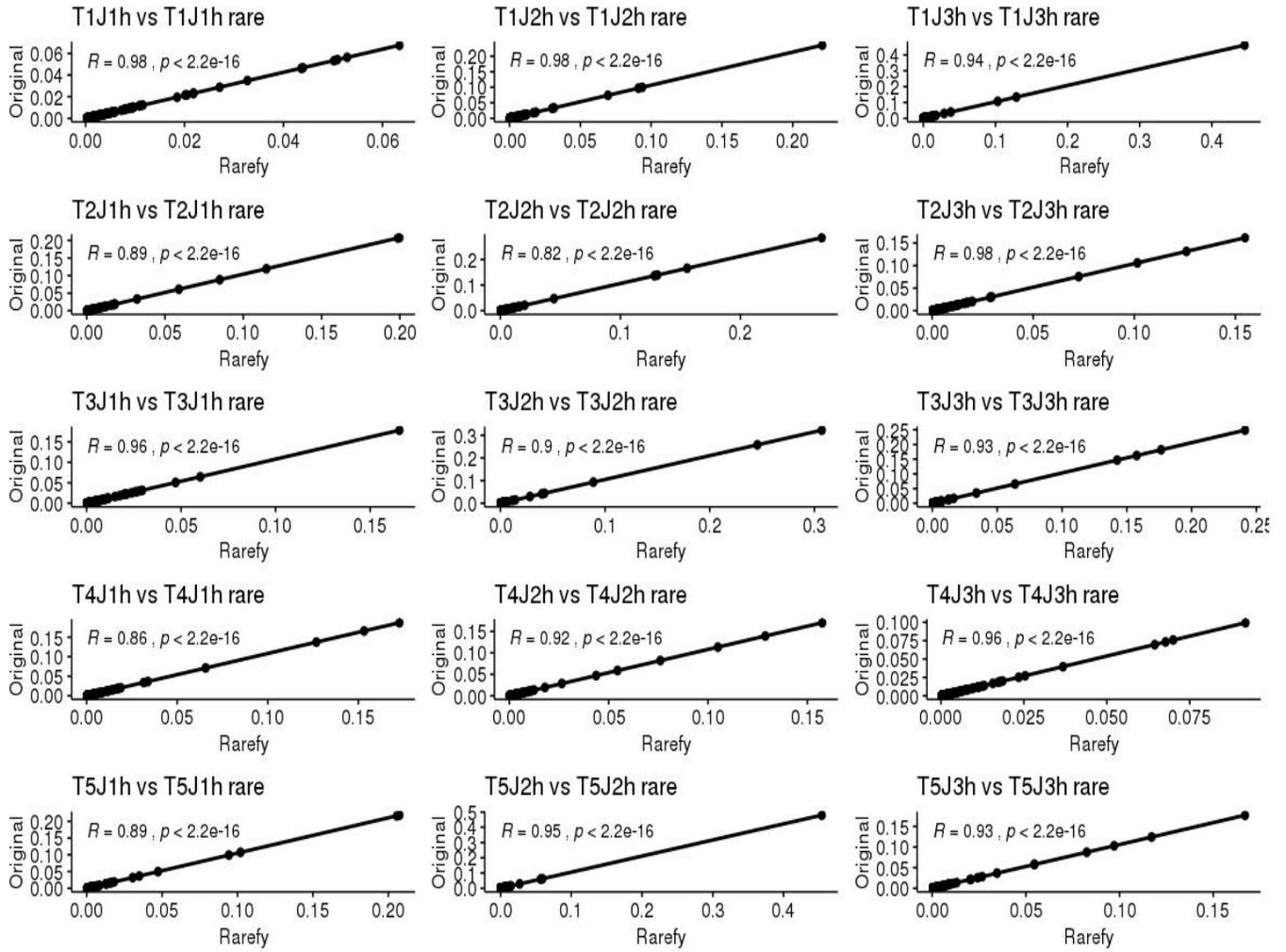
FiguraS3. Profundidad de librerías



FiguraS4. Profundidad de las librerías rarefaccionada.

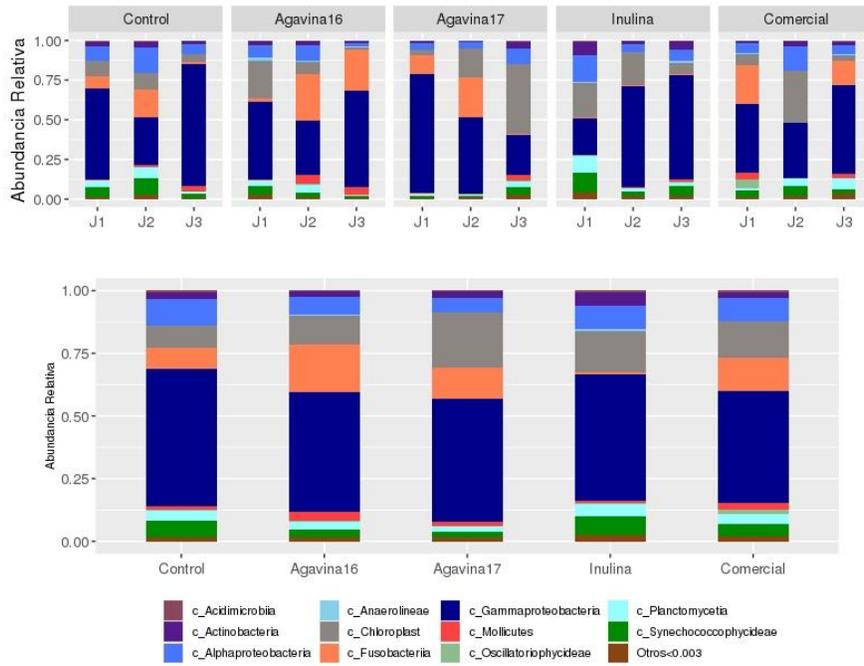


FiguraS5. Correlación de Spearman muestra original vs muestras rarefaccionadas intestino.

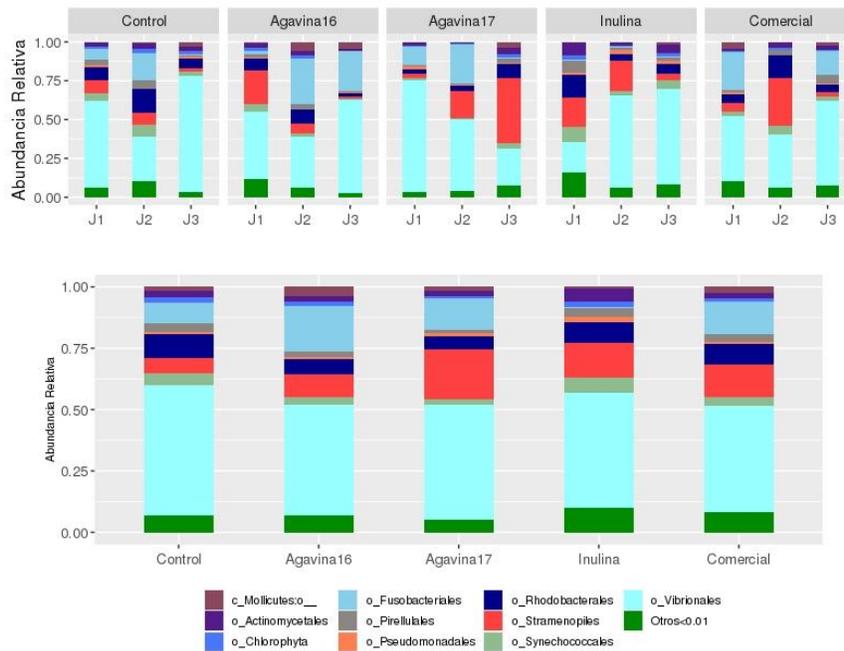


FiguraS6. Correlación de Spearman muestra original vs muestras rarefaccionadas hepatopáncreas.

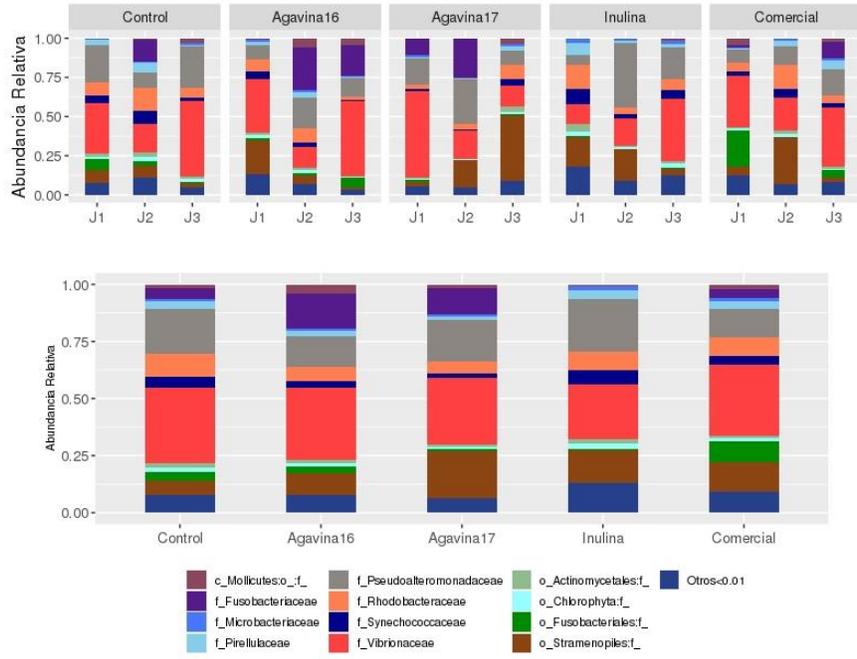
10.3.1. Perfil taxonómico del intestino



FiguraS7. Gráfica de barras de abundancia relativa a nivel de clase en el intestino.

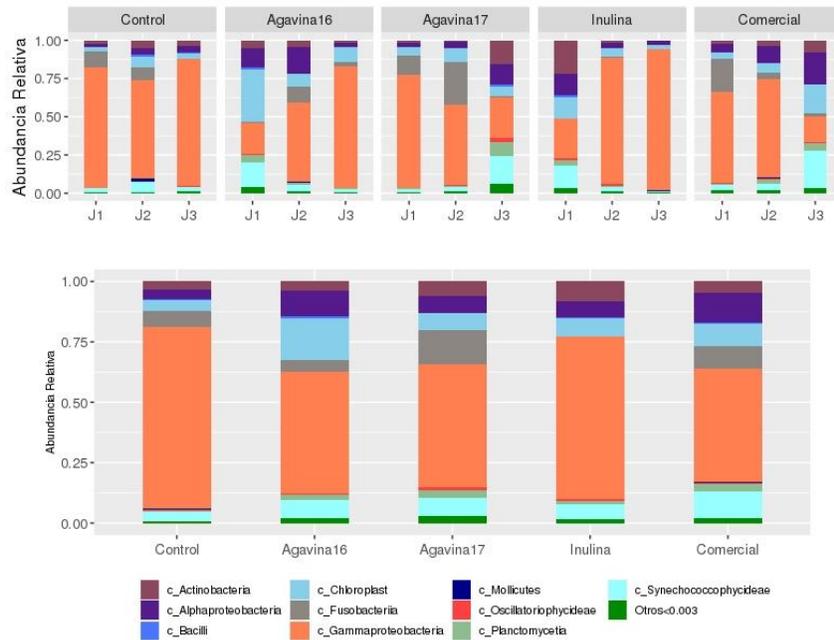


FiguraS8. Gráfica de barras de abundancia relativa a nivel de orden en el intestino.

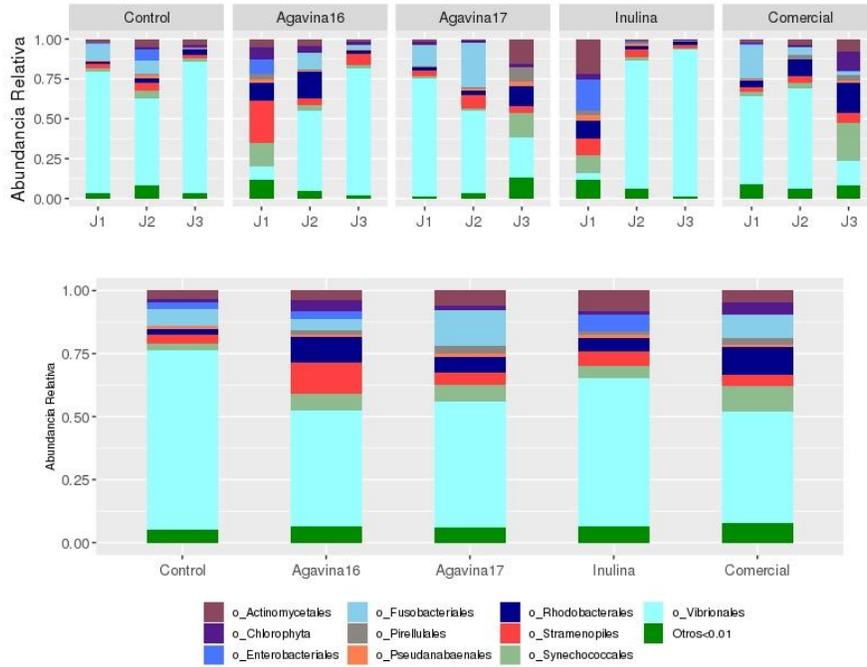


FiguraS9. Gráfica de barras de abundancia relativa a nivel de familia en el intestino.

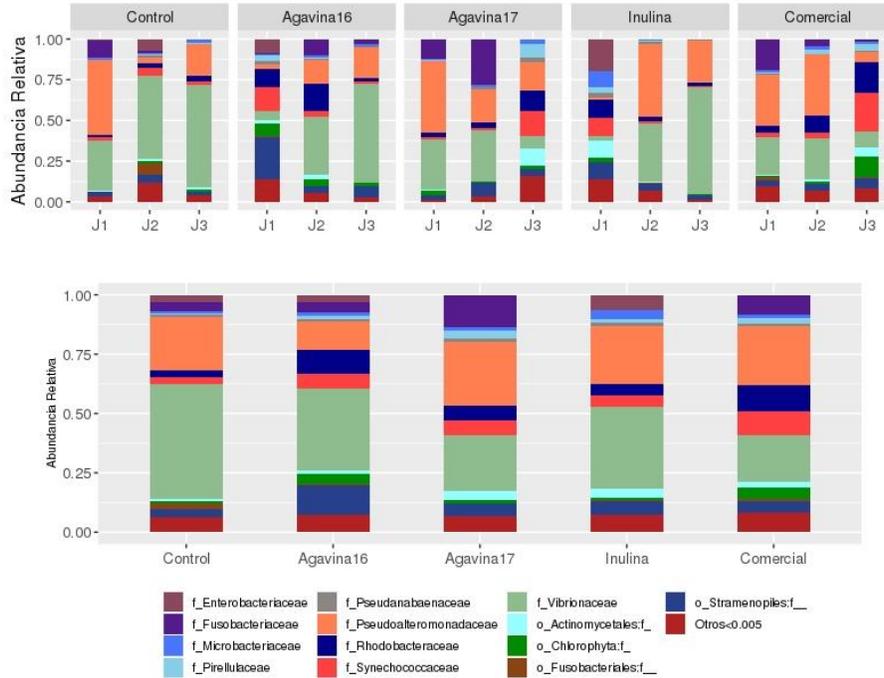
10.3.2. Perfil taxonómico del hepatopáncreas



FiguraS10. Gráfica de barras de abundancia relativa a nivel de clase en el hepatopáncreas.



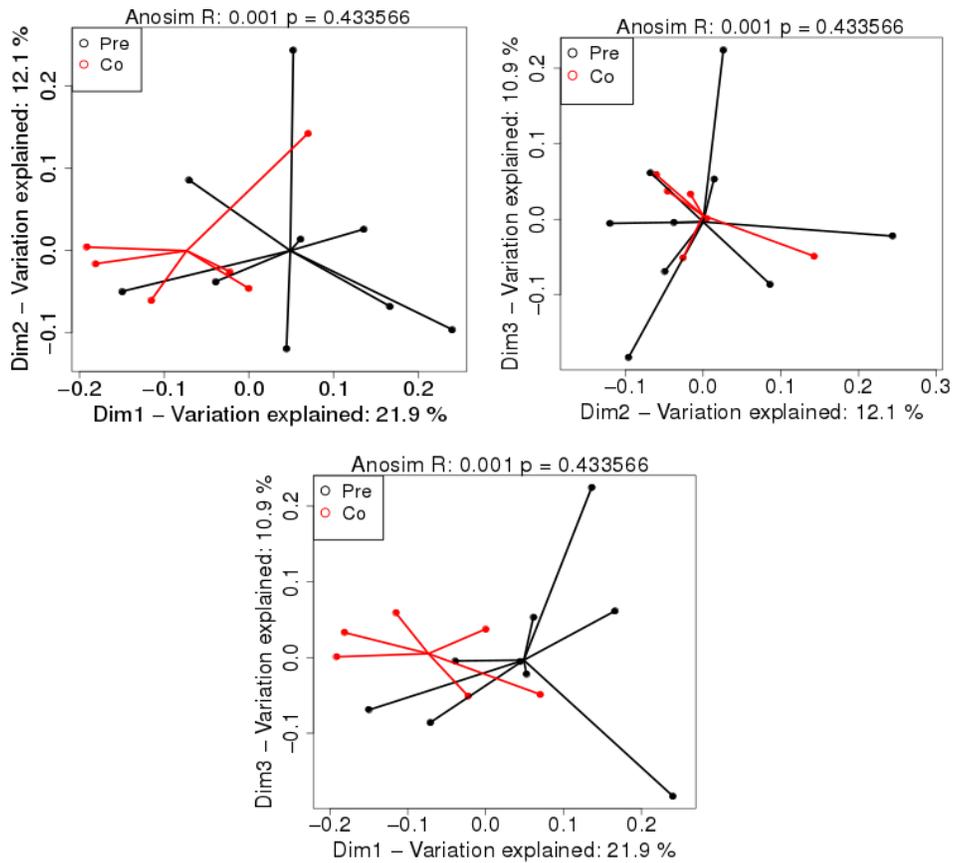
FiguraS11. Grafica de barras de abundancia relativa a nivel de orden en el hepatopáncreas.



FiguraS12. Grafica de barras de abundancia relativa a nivel de familia en el hepatopáncreas.

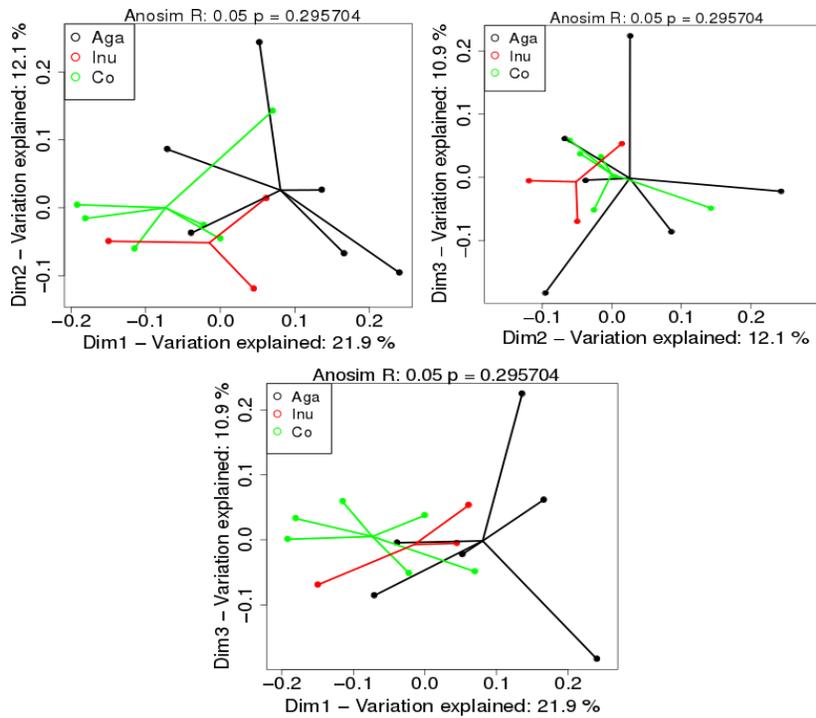
10.4. Diversidad beta

10.4.1. Diversidad beta del intestino



FiguraS13. Tratamientos con prebiótico vs tratamientos sin prebiótico.

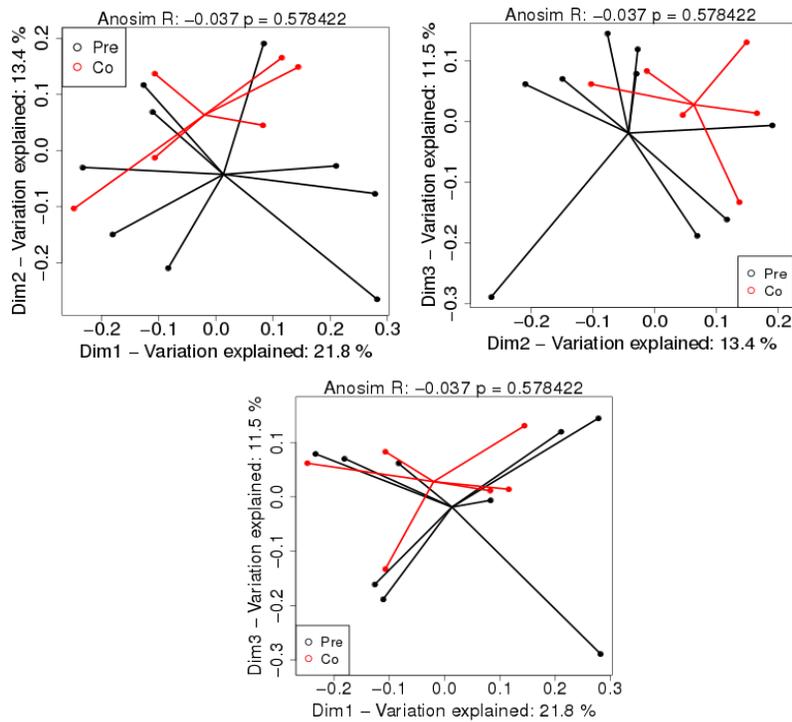
ANOSIM R= 0.001, p=0.434. No hay diferencia significativa en la composición de la microbiota entre los tratamientos suplementados con prebiótico y los que no.



FiguraS14. Estructura de prebiótico.

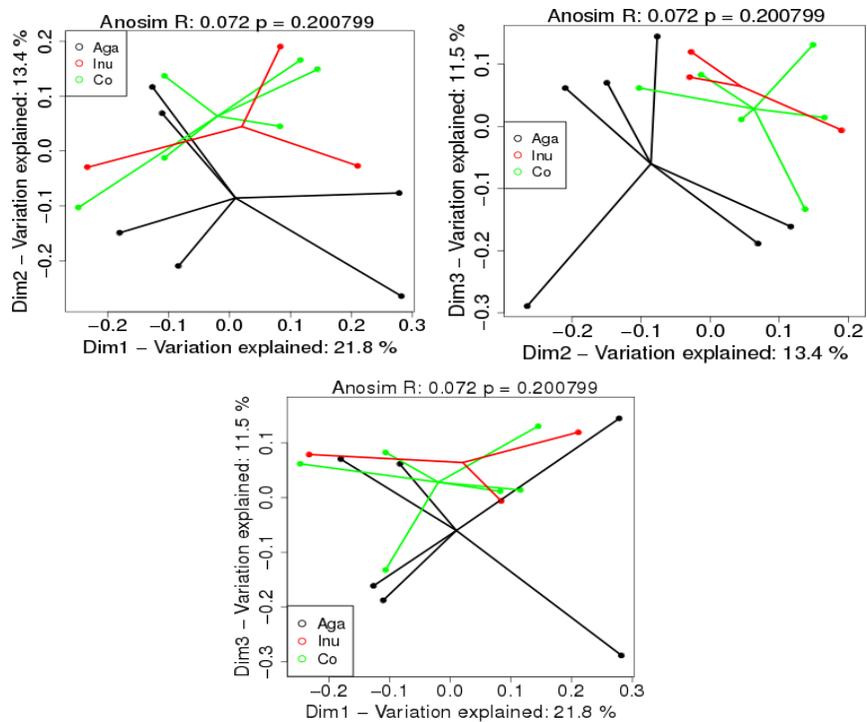
ANOSIM R= 0.05, p=0.296. No hay diferencia significativa en la composición de la microbiota entre los tratamientos sin prebiótico vs tratamientos con agavina y el tratamiento de inulina.

10.4.2. Diversidad beta del hepatopáncreas



FiguraS15. Tratamientos con prebiótico vs tratamientos sin prebiótico en el hepatopáncreas.

ANOSIM R= -0.037, p=0.57. No hay diferencia significativa en la composición de la microbiota entre los tratamientos suplementados con prebiótico y los que no.



FiguraS16.Estructura de prebiótico en el hepatopáncreas.

ANOSIM R= 0.072, p=0.200. No hay diferencia significativa en la composición de la microbiota entre los tratamientos sin prebiótico vs tratamientos con agavina y el tratamiento de inulina.