



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y  
FORESTALES**



**EFFECTO DE LA ALIMENTACIÓN SUPLEMENTADA CON BETA-GLUCANOS  
AISLADOS Y PARED CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* EN LA  
MICROBIOTA INTESTINAL DE LA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) Y SU  
DESEMPEÑO EN CULTIVO**

**TESIS**

**QUE PRESENTA**

**MVZ. Yessica Yudith Márquez Martínez**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Director de Tesis: Dr. Jorge Fonseca Madrigal

Co-Director de Tesis: Dr. Carlos Cristian Martínez Chávez

Morelia, Michoacán. Marzo de 2020.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	11
OBJETIVO GENERAL .....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
HIPÓTESIS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
ORGANISMOS EXPERIMENTALES.....	12
DIETAS EXPERIMENTALES.....	12
EXPERIMENTO DE DESEMPEÑO EN CULTIVO.....	13
ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS .....	14
EXPERIMENTO MICROBIOMA NTESTINAL .....	17
TOMA DE MUESTRAS PARA MICROBIOMICA .....	18
ANÁLISIS DEL MICROBIOMA INTESTINAL .....	18
ESTADÍSTICA .....	20
RESULTADOS .....	21
DESEMPEÑO EN CULTIVO.....	21
MICROBIOTA INTESTINAL .....	25
DISCUSIÓN .....	30
CONCLUSIONES .....	34
REFERENCIAS.....	35
ANEXOS .....	39

## RESUMEN

El aumento en la demanda de proteína de origen animal, hace que un objetivo sea maximizar y optimizar la producción, aumentando a su vez la susceptibilidad a enfermedades de los organismos cultivados. Los peces están expuestos a un alto contenido de bacterias muchas de ellas patógenas, siendo las infecciones bacterianas el mayor problema en la producción acuícola. El uso de aditivos en el alimento como prebióticos ha sido una alternativa para la solución de dicha problemática ya que, entre otros efectos, existen evidencias de que estos aditivos favorecen el funcionamiento del sistema inmune de los peces. En el presente trabajo se evaluó el efecto del uso de los prebióticos en la microbiota intestinal y en el crecimiento de la tilapia (*Oreochromis niloticus*). Se utilizaron dos dietas, una enriquecida con pared celular de levadura, otra enriquecida con  $\beta$ -glucanos aislados y una control. El diseño experimental consistió de dos experimentos, uno, para el efecto de los prebióticos en los parámetros zootécnicos ya que se registraron las mejores ganancias de peso y talla en tilapias alimentadas con prebióticos (pared celular de levadura). Segundo experimento, fue un análisis de secuenciación del gen 16S rRNA en heces de peces expuestos a los diferentes tratamientos, se logró determinar las poblaciones microbianas transitorias y a través de comparaciones entre los distintos tratamientos, se identificó una microbiota núcleo en donde se registró el género *Cetobacterium* en el 100% de la muestras. La microbiota forma agrupaciones, que se diferencian del control, este cambio ocurre a partir de la segunda Y tercera semana, volviéndose nuevamente similar para la cuarta semana. Estos resultados nos podrían ayudar a entender la manera en la que actúan los prebióticos sobre el microbioma intestinal de la tilapia, con datos como que la comunidad microbiana se ve modulada solo en un lapso de tiempo, esta modificación consiguió mejorar algunos parámetros productivos, esto también ayudará a la formulación de alimentos para esta especie.

Palabras clave: demanda, ganancia, prebióticos, microbioma, modulada

## ABSTRACT

The increase in the demand for protein of animal origin, makes it an objective to maximize and optimize production, in turn increasing the susceptibility to diseases of cultured organisms. Fish are exposed to a high content of bacteria, many of them pathogenic, with bacterial infections being the biggest problem in aquaculture production. The use of additives in food as prebiotics has been an alternative for the solution of this problem since, among other effects, there is evidence that these additives favor the functioning of the fish's immune system. In this work, the effect of the use of prebiotics in the intestinal microbiota and the growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*) was evaluated. Two diets were used, one enriched with yeast cell wall, another enriched with isolated  $\beta$ -glucans and a control. The experimental design consisted of two experiments, one, for the effect of prebiotics on zootechnical parameters since the best weight and height gains were recorded in tilapia fed with prebiotics (yeast cell wall). Second experiment, was a sequencing analysis of the 16S rRNA gene in fish feces exposed to the different treatments, it was possible to determine the transient microbial populations and through comparisons between the different treatments, a core microbiota was identified where the genus *Cetobacterium* was recorded in 100% of the samples. The microbiota forms clusters, which differ from the control, this change occurs from the second and third week, becoming again similar for the fourth week. These results could help us understand the way in which prebiotics act on the intestinal microbiome of tilapia, with data such as that the microbial community is modified only in a period of time, this modification managed to improve some productive parameters, this also It will help the formulation of food for this species.

## INTRODUCCIÓN

La producción de especies pecuarias en forma intensiva ha aumentado debido a la demanda de alimentos causada por el crecimiento de la población (Huerta, *et al.*, 2005).

La pesca y la acuicultura no son excepción ya que son una importante fuente de alimento, nutrición, ingresos económicos y un medio de vida para cientos de millones de personas. De hecho, la oferta mundial *per cápita* de productos acuáticos alcanzó un nuevo máximo histórico de 20 kg en 2014, gracias a un intenso crecimiento de la acuicultura, que en la actualidad proporciona la mitad de todo el pescado y marisco destinado al consumo humano (FAO, 2016).

En México, las especies que principalmente se cultivan son camarón, tilapia y ostión. Para el 2008, el 45.91% de la producción correspondía al camarón, el 25.04% a la tilapia y el 14.86% para el ostión (Mojica *et al.*, 2010).

Un objetivo persistente en varios tipos de acuicultura es maximizar y optimizar la producción para lo cual se han intensificado los diversos sistemas productivos. Lo anterior conlleva a una mayor susceptibilidad a enfermedades de los organismos cultivados debido a una mala calidad de agua lo cual genera un aumento en el estrés (Gatlin *et al.*, 2006; Carbone y Faggio, 2016).

Específicamente los peces en cultivo, se encuentran expuestos a un alto número de bacterias presentes en el agua, siendo muchas de ellas patógenas facultativas. De hecho, en los sistemas intensivos de acuicultura, las infecciones bacterianas son el mayor problema y la causa de grandes pérdidas económicas (Wang *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2016).

En el sector productivo, la tilapia es ampliamente utilizada por poseer una gran capacidad de adaptación a diferentes temperaturas, un rápido crecimiento, alta

eficiencia en la conversión del alimento, mayor tolerancia a inadecuada calidad del agua, por ser resistente a parásitos y enfermedades, etc. (Mojica *et al.*, 2010).

En la actualidad, el diseño de dietas para alimentación acuícola, va encaminado no sólo a proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo, sino también proporcionar ingredientes funcionales que mejoren el estado de salud del organismo (Burr *et al.*, 2005). Además, el estado nutricional de los peces y el estrés van a influir en su estado inmunológico y por lo tanto en la defensa contra enfermedades (Gatlin *et al.*, 2006).

El uso de antibióticos en la industria acuícola ha sido catalogado como un problema tanto ambiental como de salud. Se ha sugerido que el uso no restringido de antibióticos en la acuicultura mundial tiene el potencial de afectar a la salud humana y animal, y que este problema debe ser tratado a través de enfoques preventivos locales y globales unificados (Cabello, 2006; Escobar *et al.*, 2006; Carbone *et al.*, 2016; Jung, 2016). Por lo anterior, existe una creciente necesidad por adoptar el uso de técnicas alternativas de control de enfermedades, sustancias profilácticas en nutrición, por ejemplo microorganismos, prebióticos, oligosacáridos o mezclas de estos componentes (Jung, 2016).

Específicamente, el uso de probióticos y prebióticos en acuicultura a incrementado considerablemente, como una alternativa sustentable a el uso de antibióticos. La meta principal de la administración de probióticos (organismos vivos) se encuentra definida como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas como parte de un alimento, confieren al huésped un beneficio para la salud” (FAO, 2002; OMS, 2002). Sin embargo los prebióticos son definidos como “fibras dietéticas no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el intestino, así como por fermentación de productos que promueven el crecimiento de microbios benéficos” (Gibson, 1995; Roberfroid, 2007). Por lo tanto, este tipo de aditivos ha generado interés en la industria

acuícola con la finalidad de manipular la microbiota intestinal y mejorar el desempeño del hospedero, excluyendo a patógenos oportunistas (Candys, 2017). El tracto gastrointestinal de los vertebrados, es un ecosistema microbiano que alberga un consorcio complejo y dinámico de microorganismos (microbiota intestinal), los cuales desempeñan papeles críticos en la nutrición y la salud del huésped (Brugman y Nieuwenhuis 2010; Cerf-Bensussan y Gaboriau-Routhiau 2010).

En algunos estudios donde se usaron Beta-glucanos ( $\beta$ -glucanos) y probióticos micro-encapsulados, mejoraron la administración de probióticos en el tracto digestivo del camarón y observaron un incremento significativo del peso, así como una modificación en su microbiota intestinal (Boonanuntanasarn, 2016).

Los principales efectos benéficos al usar  $\beta$ -glucanos están relacionados con cambios en la microbiota que se traducen en una mejora del crecimiento, así como en un aumento de la respuesta del sistema inmune, como se ha visto en el esturión (*Acipenser persicus*) que alcanzó un poco más del doble del peso en 6 semanas (Mohammad *et al.*, 2015) o en la carpa (*Cyprinus carpio* L.) se en donde se observó un crecimiento del 600% después de 8 semanas (Kühlwein *et al.*, 2013).

Los prebióticos como la pared celular y los  $\beta$ -glucanos, tienen acción en la modificación o regulación de la microbiota intestinal, en la abundancia de cierto phylum de bacterias o en la estimulación selectiva de ciertas bacterias en los animales (Nayak, 2010; Roberfroid, 2007).

### *Microbiota núcleo*

Los organismos acuáticos tienen una microbiota en común, la que se denomina “core gut microbiota” o microbiota núcleo intestinal. En peces, tanto marinos como dulceacuícolas, se ha determinado que Proteobacteria es el phylum dominante

seguido de Firmicutes, Fusobacteria y Bacteroidetes, y éstos comprenden hasta el 90% de los grupos bacterianos presentes en el intestino (Gómez, 2017). Debido a que estos grupos son casi siempre encontrados, se ha especulado que contribuyen de manera importante a las funciones del hospedero, tales como digestión, absorción de nutrientes y respuesta inmune, además de que el hábitat intestinal tiene sitios que “seleccionan” a estos grupos (Roeselers *et al.*, 2011).

### *Microbiota residente y transitoria*

Existen dos grupos distintos de microorganismos en el intestino de los animales, es decir, la microbiota alóctona (transitoria) y autóctona (adherente), generalmente se encuentran en el tracto gastrointestinal de los peces. El último grupo de bacterias, en virtud de su capacidad para tolerar el bajo pH en el estómago, así como la resistencia a las acciones de los ácidos biliares, solo logra colonizar la superficie epitelial del estómago, intestino delgado y grueso (Banerjee *et al.*, 2017). Mientras que existen bacterias que tiene la facilidad de unirse firmemente a la mucosa intestinal (moco que forma una capa que separa el contenido luminal del epitelio intestinal) para convertirse en la microbiota autóctona (adherente) del huésped. Tenemos el otro grupo de bacterias que está también presente, pero de manera transitoria en el tracto gastrointestinal porque no pueden colonizar la capa mucosa y / o la superficie epitelial ya que carecen de la habilidad de adherirse a esta capa del intestino o son tan ineficaces como otras bacterias (Ring y Birkbeck 1999).

En la lubina (*Dicentrarchus labrax*) encontraron que la microbiota residente era más diversa que la transitoria y lo atribuyeron a la menor presencia de bacterias asociadas al mucus (Diéguez *et al.*, 2014). Diferencias significativas entre ambos tipos de microbiota también se han reportado para el pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*), con una mayor riqueza de Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs por sus siglas en inglés) en la transitoria que en la residente (García, 2016). Un comportamiento similar se observó en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en



donde tanto la riqueza como la abundancia de bacterias fue mayor en la microbiota transitoria, que esta presente en la “contenido luminal o bolo alimenticio” a diferencia de la residente que esta presente en la “mucosa” intestinal de los organismos (Gajardo *et al.*, 2016).

En la tilapia, se han observaron cambios en la microbiota en el colon y en el ciego en periodos de inanición, con cambios de temperatura del agua, productos químicos, antibióticos, pesticidas, alimentación y condiciones de alimentación, etapas de crecimiento (Ni *et al.*, 2014; Brunvold *et al* 2007; Reid *et al.* 2009; Kohl *et al.*, 2014).

Por otro lado las dietas suplementadas con prebióticos han demostrado generar una mayor diversidad microbianas del tracto digestivo. Una manera de evaluar la eficiencia de los prebióticos es determinar la abundancia de las diferentes especies de bacterias en el intestino de los peces a través del tiempo (Jatoba *et al.*, 2010).

En peces de agua dulce las bacterias mas comúnmente encontradas son, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas sp.*, *Acinobacter sp.* *Pseudomonas sp.* Las especies bacterianas predominantes pertenecen al filo, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* y *Gammaproteobacteria*. Algunas de estas bacterias contribuyen al estado nutricional del pez o a procesos nutricionales como la degradación de moléculas complejas y producción de vitaminas. (Tsuchiya *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2016)

En peces, la microbiota intestinal puede regular la expresión de mas de 200 genes en el tracto digestivo, no solamente controlar la proliferación epitelial, si no el metabolismo de algunos nutrientes y también la respuesta inmune. Algunas bacterias en el tracto digestivo producen compuestos que posiblemente intervienen en el control de la colonización de bacterias patógenas, dado que una gran población de bacterias excluye competitivamente a los patógenos, al ocupar receptores y competir por el espacio y los nutrientes (Rastall, 2014).

La suplementación en el alimento con prebióticos induce el crecimiento en proporción de algunas especies bacterianas predominantes como se comprobó en *Solea senegalensis* (Tapia *et al.*, 2010).

#### *Prebióticos como aditivos alimenticios*

Los prebióticos son aditivos alimenticios que han sido ampliamente estudiados, como es el caso de los  $\beta$ -glucanos. Estos carbohidratos están presentes en las paredes celulares de los granos de cereales, bacterias, algas, levaduras y hongos (Zekovic *et al.*, 2005).

Existen diversas maneras de aislar a los  $\beta$ -glucanos, por medio de la hidrólisis de las levaduras a través de métodos químicos (hidrólisis ácida y química), métodos físicos (hidrólisis térmica) y métodos biológicos (autólisis con o sin control, hidrólisis enzimática) (Olivar *et al.*, 2008).

Los efectos de los  $\beta$ -glucanos dependen del peso molecular y el grado de ramificación, moléculas cortas y de peso molecular bajo favorecen la ganancia de peso en la tilapia (*Oreochromis niloticus*). Su estructura se ve afectada por el método de extracción, así sea la misma muestra base de levadura (Pilarski, 2017).

Se ha demostrado que los  $\beta$ -glucanos como aditivo alimenticio activan directamente los leucocitos, estimulan la fagocitosis por medio de los macrófagos, la actividad citotóxica y antimicrobiana, que repercute en una mayor resistencia a patógenos (Piñeros *et al.*, 2012).

La utilización de paredes celulares de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como prebiótico en la alimentación de animales, se ha convertido en una opción para la sustitución de antibióticos. Dichas paredes celulares están constituidas de oligosacáridos, principalmente manano-oligosacáridos (MOS) y  $\beta$ -glucanos, capaces de actuar en el tracto gastrointestinal disminuyendo la microbiota patógena e interactuando con las células del sistema inmune, lo que beneficia la

salud del hospedero. Los oligosacáridos (mananos y  $\beta$ -glucanos) no son digeribles por las enzimas intestinales, por lo que llegan intactos al colon. Debe considerarse que los microorganismos del colon constituyen el mayor potencial metabólico del organismo. El elevado número y variedad de bacterias que cohabitan en el tracto gastrointestinal constituyen un complejo ecosistema metabólicamente muy activo y versátil, con capacidad de adaptarse a sustratos disponibles (Pérez *et al.*, 2014).

Existe numerosa información con respecto a los efectos positivos de los  $\beta$ -glucanos en animales de granja como cerdos (Li *et al.*, 2006), aves (Chen *et al.*, 2008), en peces como *Sparus aurata* y *Dicentrarchus labrax* (Ganduly y Prasad, 2012; Carbone y Faggio, 2016) como salmónidos (Lauridsen y Buchmann, 2010), ciprínidos (Siwicki *et al.*, 2010), moluscos (Hai y Fotedar, 2009), y otros peces (Schoulz *et al.*, 1999; Li & Gatlin, 2003; Li & Gatlin, 2004). En tilapia (*Oreochromis niloticus*), la pared celular demostró mejorar la ganancia de peso y una resistencia al estrés así como a enfermedades (Abass, 2108).

Asimismo, existe evidencia de que peces alimentados con un prebiótico rico en  $\beta$ -glucanos, presentan una mejor salud intestinal, presentando un aumento en la densidad de las microvellosidades del intestino y, en consecuencia, una mejor asimilación de los nutrientes ofrecidos en la dieta (Abu-Elala, 2013).

En el grupo de investigación del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH han encontrado un mejor desempeño en cultivo de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) cuando fue alimentada con un aditivo que contenía pared celular de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y Seleno-levadura (Fonseca *et al.*, 2016).

Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende analizar los efectos efecto que tiene el uso de los prebioticos en los parámetros productivos y en la posible modificación de la microbiota intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*).

## JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia de que la pared celular de levadura y los  $\beta$ -glucanos que la componen, tienen un efecto positivo sobre el crecimiento, sin embargo, se desconoce la acción específica de dichos aditivos, considerados prebióticos, en el microbioma intestinal de esta especie. Los resultados servirán para tener un mejor entendimiento de la nutrición en la Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y darán información relevante para la formulación y diseño de alimentos más efectivos para coadyuvar al desarrollo del cultivo de esta especie.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación con  $\beta$ -glucanos aislados y pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* en el desempeño en cultivo y en el microbioma intestinal de la tilapia *Oreochromis niloticus*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la suplementación alimenticia con  $\beta$ -glucanos aislados y con pared celular de levadura en el desempeño en cultivo de la tilapia.

Analizar y comparar la acción de los  $\beta$ -glucanos aislados y la pared celular de levadura, en el microbioma intestinal de la tilapia.

## HIPÓTESIS

La suplementación alimenticia con  $\beta$ -glucanos aislados y pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* tendrá un efecto positivo en el desempeño de la tilapia y su microbiota intestinal será modificada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales unidad San Juanito, de la Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo.

### *Organismos experimentales*

Los organismos experimentales fueron suministrados por la empresa TECNOPEZ, S. de P.R. de R.L. ubicada en el Municipio de Medellín de Bravo, Veracruz. Los organismos fueron transportados vía aérea con certificado de inocuidad y salud. Los peces fueron medidos y pesados antes del inicio del experimento, y se mantuvieron en aclimatación en el sistema experimental, durante dos semanas, antes de iniciar el experimento.

### *Dietas experimentales*

El alimento balanceado fue elaborado por una empresa comercial de alimentos para tilapia, cumpliendo con los requerimientos nutricionales para la especie, además de contener los aditivos alimenticios experimentales y formuladas con un 32% de proteína y 5% de lípidos. La alimentación de los peces se llevó a cabo tres veces al día con una ración de alimento ajustada al peso de los animales (5% de su peso corporal).

Se formularon tres alimentos balanceados para tilapia con distintos porcentajes de inclusión de prebióticos, 1) una dieta control sin incluir aditivos, 2) una dieta con 125 g de  $\beta$ -glucanos por tonelada de alimento, y 3) una dieta con 250 g de pared celular de levadura por tonelada de alimento.

### *Experimento de desempeño en cultivo*

El experimento se llevó a cabo en un invernadero de 10x20m, el sistema experimental consistió en 15 tanques circulares de 2m de diámetro con aireadores, un sedimentador, pediluvios y una bomba para circulación de agua. Se realizaron recambios de agua tres veces por semana para mantener la calidad de agua en condiciones óptimas para el desarrollo en cultivo de la tilapia, con excepción de la temperatura, que no fue controlada pero que junto con otros parámetros físico-químicos fueron monitoreados semanalmente (oxígeno disuelto, pH, amonio, nitritos y nitratos).

El trabajo experimental se diseñó con 5 repeticiones para cada tratamiento, cada repetición contenía 27 peces para un total de 135 peces por tratamiento, siendo el alimento la única variable independiente.

El peso inicial de los organismos fue de  $19.1 \pm 5.3$  g y una longitud total aproximada de  $10.6 \pm ?$  cm. El experimento de alimentación se realizó por 3 meses, tiempo en el que los organismos alcanzaron un peso de aproximadamente  $77 \pm 24.4$  g y una longitud total promedio de  $15 \pm 1.8$  cm.

Al término de los tres meses de experimentación se evaluó su desempeño en cultivo tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- Supervivencia (%) = (número de peces vivos/número inicial de peces)\*100.
- Peso ganado (PG) = peso final en (g) – peso inicial (g).
- Peso ganado (%) =  $\text{Peso ganado} \times 100 / \text{peso inicial}$ .
- Peso en canal (g) = Peso total del pez sin vísceras.
- Índice viscerosomático (VSI) = Definida como la proporción del peso de las vísceras con respecto al peso corporal total del organismo.
- Índice hepatosomático (HSI) = Definido como la proporción del peso del hígado con respecto al peso corporal total del organismo.

- Largo total (LT)= Largo de la punta del hocico del pez hasta la punta del lóbulo más largo de la aleta caudal.

Se realizaron 40 biometrías al inicio del experimento para determinar el peso inicial de los organismos. Al final del experimento, después de 90 días de alimentación, todos los organismos experimentales fueron medidos y pesados para la determinación final de los parámetros de desempeño en cultivo.

#### *Análisis Bromatológicos.*

Al inicio, y al final del experimento (90 días), fueron colectados dos peces por tratamiento y seis muestras del alimento extruido para la realización de análisis proximales (porcentaje de humedad, fibra, proteína, extracto etéreo, extracto libre de nitrógeno y cenizas).

#### *-Humedad.*

La determinación del contenido de humedad se realizó mediante el uso del método 10.184 (A.O.A.C., 2000).

La determinación del contenido de humedad es una de las mediciones analíticas más importantes y más ampliamente usadas en el procesamiento y análisis de productos alimenticios. Los métodos comúnmente usados son los de secado, los cuales consisten en someter las muestras a condiciones de temperatura de 150 °C por 12 horas, para permitir la deshidratación de la muestra, causando una disminución en el peso, que permite determinar el contenido de humedad del alimento.

Cálculo:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = [(A-B)/A]*100$$

Donde:

A= Peso de la muestra húmeda (g).

B= Peso de la muestra seca (g).

#### *-Extracto Etéreo*

El método Soxhlet utiliza un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en el alimento, esto se realizó utilizando un equipo Soxtec Avanti (modelo 2050). La extracción se realizó adicionando éter de petróleo a la muestra como solvente (A.O.AC., 2000).

Cálculos:

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = [(B-A)/C]*100$$

Donde:

A= Peso del crisol limpio y seco (g).

B= Peso del crisol con grasa (g).

C= Peso de la muestra (g).

#### *-Cenizas*

El porcentaje de cenizas corresponde al contenido de minerales totales o materiales inorgánicos de una muestra. Se determinó por calcinación de la muestra en una mufla a 550°C por 12 horas a peso constante (A.O.A.C.,2000).

Cálculos:

$$\text{Contenido de cenizas} = 100\% \{(A-B)/C\} * 100\}$$



Donde:

A= Peso del crisol con muestra (g).

B= Peso del crisol con cenizas (g).

C= Peso de la muestra (g).

- *Extracto libre de nitrógeno*

El extracto libre de nitrógeno es una medida que representa el porcentaje total de carbohidratos en una muestra. Éste se obtuvo simplemente al restar al 100% la suma de los componentes analizados previamente (humedad, proteína, lípidos y cenizas) (A.O.A.C., 2000).

Cálculos:

Extracto libre de nitrógeno (%) =  $100 - (A+B+C+D)$ .

Donde:

A= contenido de humedad (%).

B= Contenido de proteína cruda (%).

C= Contenido de extracto etéreo (%).

D=Contenido de cenizas (%)

## Experimento microbioma intestinal

Para evaluar el efecto de las dietas en el microbioma intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) se diseñó un sistema de cultivo en el cual cada pez se mantuvo en contenedores con dimensiones de 30 cm de largo y 15 cm de ancho, y con un volumen de agua de 10 L. Dichos contenedores se instalaron con suministro de aire para mantener la oxigenación adecuada y se realizaron recambios de agua diariamente. En total se instalaron 10 contenedores para cada tratamiento, teniendo un total de 30 organismos experimentales (Fig.1).



Figura 1. Esquema del diseño experimental, para la alimentación y toma de muestras de los organismos experimentales (*Oreochromis niloticus*).

El alimento ofrecido en este experimento fue una dieta enriquecida con  $\beta$ -glucanos, una dieta enriquecida con pared celular de levadura y una dieta control.

Los peces fueron alimentados individualmente tres veces al día por 30 días, a saciedad aparente.

Los 30 organismos utilizados para este experimento fueron obtenidos del grupo control del experimento de desempeño en cultivo. Todos con un peso y tamaño similar ( $12.5 \pm 0.5$  cm).

#### *Toma de muestras para microbiómica*

A partir del inicio de la alimentación con las dietas experimentales, se extrajeron las digestas directas del intestino de los organismos, una vez por semana durante cuatro semanas. Esto se logró realizando un masaje abdominal en dirección craneal-caudal hasta obtener una muestra mínima de 20 mg de heces. Posteriormente, la muestra se colocó en tubos estériles eppendorf de 1.5 ml y adicionó alcohol al 96% para fijar la muestra y mantenerla a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su posterior análisis.

#### *Análisis del microbioma intestinal*

Una vez tomadas las muestras del contenido intestinal se realizó la extracción de DNA mediante el protocolo CTAB obteniendo un mínimo de 5 ng de DNA genómico microbiano.

El método CTAB consiste en los siguientes pasos: colocar las muestras en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml, agregar 480  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.5 M y 120  $\mu\text{L}$  de lisozima, incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min, posteriormente centrifugar por 2 min a 15,000 rpm, descartar el sobrenadante, agregar 350  $\mu\text{L}$  de buffer CTAB a cada tubo, agregar 20  $\mu\text{L}$  de proteínasa K en una concentración de 20 mg/mL y agitar brevemente, colocar los tubos en un termoblock a  $55^{\circ}\text{C}$  hasta que el tejido esté lo suficientemente digerido, agregar 300  $\mu\text{L}$  de LiCl 5M, 5  $\mu\text{L}$  de RNasa y agitar por

un minuto; posteriormente agregar 600  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitar brevemente, agitar la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Extraer 500  $\mu$ L de la capa acuosa (parte superior) del centrifugado y transferir a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, añadir 50  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 mL de Etanol al 100% frio (mantener el alcohol en el congelador); agitar y colocar a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche, centrifugar durante 20 min a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  y retirar el sobrenadante cuidadosamente para no perder el ADN sedimentado. Agregar 750  $\mu$ L de etanol al 70%, agitar por 15 min a temperatura ambiente, enseguida centrifugar a máxima velocidad (14,000 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente y retirar el sobrenadante por decantación, secar el pellet de ADN en una campana de flujo laminar, una vez seco, añadir 20  $\mu$ L de agua de  $18\Omega$  estéril para resuspender el pellet, durante 30 min a temperatura ambiente. Calentar los tubos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e inmediatamente colocar en hielo, guardar las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente se realizaron las bibliotecas para secuenciación masiva con el kit nextera XT de Illumina, el cual de manera general consta de los siguientes pasos: a) Amplificación por PCR de la región variable V4 del gen 16S RNA ribosomal; b) Limpieza de PCR utilizando las perlas magnéticas AMPure XP que elimina restos de primer y los primer-dimeros formados de la región V4 amplificada; c) PCR de Indexado que adiciona índices duales y adaptadores de secuenciación Illumina a los amplicones de la región V4; d) Limpieza de PCR utilizando las perlas magnéticas AMPure XP para limpiar la librería final antes de la cuantificación; e) cuantificación, normalización y mezclado de librerías; f) Desnaturalización de librerías y colocación de muestras en el secuenciador MiniSeq bajo el protocolo de metagenómica 16s; g) Obtención de las secuencias en archivos FASTQ. (Anexo 2).

### *Estadística*

Los datos se reportan como la media  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre medias de los distintos tratamientos se determinaron mediante ANOVA de una vía, con una significancia de  $p < 0.05$ , utilizando el programa Sigma Plot.

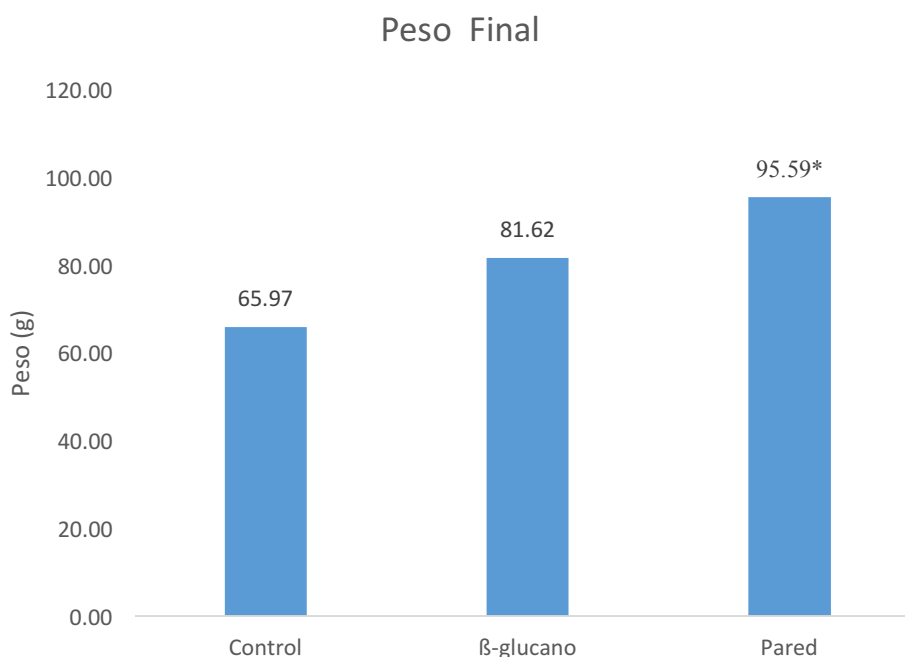
Las gráficas NMDs (Non-metric Multidimensional Scaling) de escala multidimensional no métrica, es un enfoque de análisis de gradiente indirecto que produce una ordenación basada en una matriz de distancia, que intenta representar la diferencia de pares entre objetos en un espacio de baja dimensión. Para la realización de las gráficas de abundancia de relativa en barras NMDs se utilizó el programa R versión 3.6.

## RESULTADOS

### *Desempeño en cultivo.*

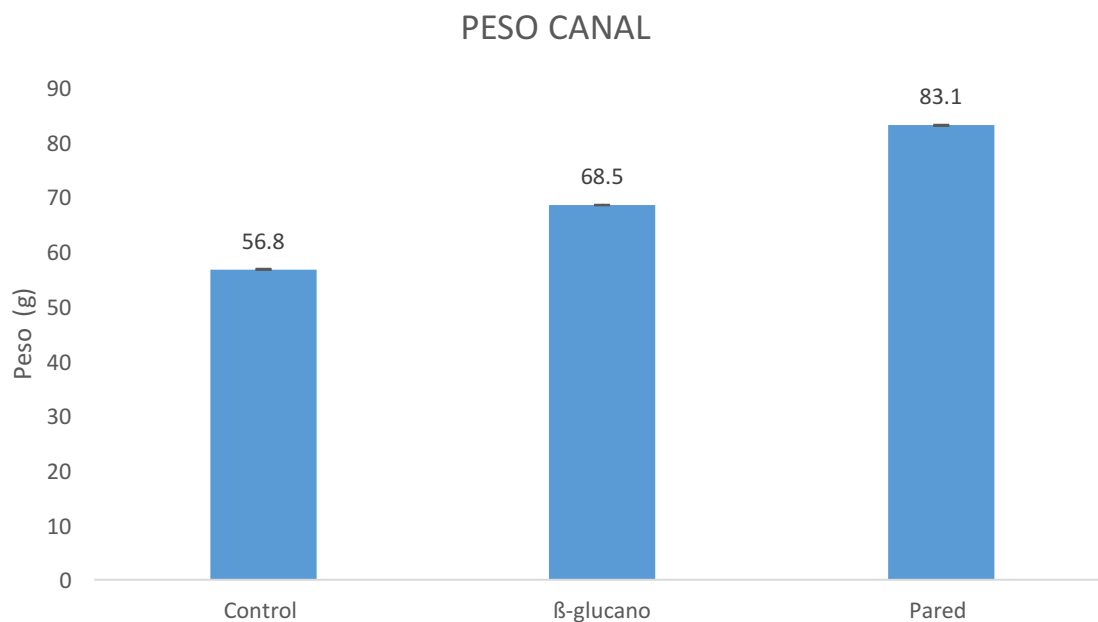
En el experimento 1, la supervivencia de los peces alimentados con pared celular fue de 100%, mientras que la del tratamiento con  $\beta$ -glucanos fue de 98%. El menor porcentaje de supervivencia se registró para el tratamiento control con un 97% de supervivencia. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos (Tabla 1).

La comparación entre los tratamientos, referente al peso final de los peces, resultó con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tres tratamientos. La mayor ganancia de peso fue obtenida con el uso de la pared celular de levadura, seguida de  $\beta$ -glucanos y finalmente la del grupo control (Fig. 2).



**Figura 2.** Peso final (g) de los organismos (*Oreochromis niloticus*) alimentados con dos diferentes prebióticos ( $\beta$ -glucanos y pared celular de levadura) y un tratamiento control sin aditivos, en un periodo experimental de 90 días. El asterisco en la tercer columna señala el grupo que presentó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Tomando en cuenta el peso en canal de los organismos al finalizar el experimento, los resultados indican que no hay diferencias significativas entre el tratamiento con pared celular y  $\beta$ -glucanos, sin embargo, con ambos tratamientos se observaron mejores resultados que con el tratamiento control (Fig. 3)



**Figura 3. Peso canal (g) de los organismos (*Oreochromis niloticus*) alimentados con dos diferentes prebióticos ( $\beta$ -glucanos y pared celular de levadura) y un tratamiento control sin aditivos, en un periodo experimental de 90 días.**

Al analizar la longitud total final a los 90 días de experimentación se pudo observar que con el uso de pared celular de levadura hay un mayor crecimiento, ya que los resultados estadísticos muestran diferencias significativas con los encontrados en los tratamientos  $\beta$ -glucano y control. Estos dos últimos tratamientos arrojaron resultados similares entre ellos, no encontrando diferencias estadísticas significativas (Fig. 4).

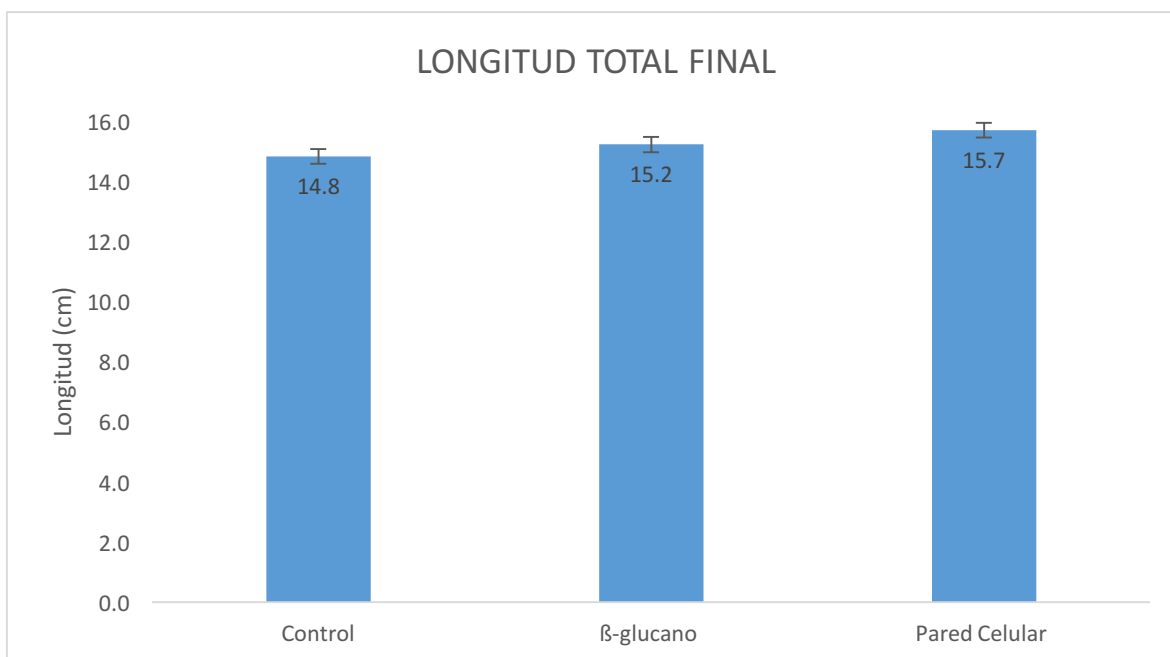


Figura4. Longitud total final (cm) de los organismos (*Oreochromis niloticus*) alimentados con dos diferentes prebióticos (β-glucanos y pared celular de levadura) y un tratamiento control sin aditivos, en un periodo experimental de 90 días.

El índice hepatosomático y viscerosomático calculado para los organismos al final del experimento, fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento control, comparado con los dos tratamientos que contenían algún aditivo prebiótico (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros productivos de los organismos (*Oreochromis niloticus*) alimentados con dos diferentes prebióticos (β-glucanos y pared celular de levadura) y un tratamiento control sin aditivos, en un periodo experimental de 90 días. Los asteriscos señalan los resultados donde hubo una diferencia significativa mayor ( $P < 0.05$ )

	CONTROL	B-GLUCANOS	PARED CELULAR
SUPERVIVENCIA (%)	97	98	100
PESO GANADO (g)	41.8±16.5	48.64±20.1	56.44±30.6
PESO GANADO (%)	214.23	239.32	267.19*
LONGITUD TOTAL (cm)	14.84±1.4	15.24±1.6	15.71±1.8
PESO CANAL (g)	56.7±13.8	68.5±17	83.1±27*
ÍNDICE VISCEROSOMÁTICO	12.03*±1.8	11.84±2.1	11.84±2.1
ÍNDICE HEPATOSOMÁTICO	3.29*±1.1	2.38±1	2.38±0.7



Por otro lado, los análisis bromatológicos de los organismos experimentales distinguen algunas diferencias entre tratamientos.

El mayor porcentaje de proteína se registró para el tratamiento con pared celular ( $P<0.05$ ) siendo diferente al encontrado en los tratamientos con  $\beta$ -glucano y en el grupo control. Por su parte, al realizar análisis bromatológicos de los peces completos, se pudo observar que los menores porcentajes de extracto etéreo (lípidos) se obtuvieron en los tratamientos que contenían prebióticos, es decir, pared celular de levadura y  $\beta$ -glucanos, siendo el tratamiento control el más alto ( $P<0.05$ ). Se realizó un análisis de extracto etéreo en las vísceras de los peces cultivados con pared celular y del grupo control el contenido de grasa perivisceral en los organismos experimentales fue mayor en los peces del grupo control (Tabla 2).

**Tabla 2. Porcentaje proximal (base seca) de tilapias completas, alimentadas con dos tratamientos con diferentes prebióticos ( $\beta$ -glucanos y pared celular de levadura) y un tratamiento control sin aditivos en un periodo experimental de 90 días. Los asteriscos señalan los resultados donde hubo una diferencia significativa mayor ( $P<0.05$ )**

	Control	$\beta$ -glucano	Pared celular	Vísceras Pared celular	Vísceras Control
Proteína	53.62	57.79	62.48*	N.A	N.A
Lípidos	30.0*	23.68	22.04	48.32*	51.24
Cenizas	15.06	16.93	16.07	N.A	N.A

N.A.= No analizado

## Microbioma intestinal

Al realizar el análisis de la secuenciación de la región V3 del gen 16S rRNA de los intestinos de la tilapia (*O. niloticus*) y al observar los resultados de la microbiota a nivel de Phylum, se observó que la abundancia relativa o riqueza de especies de bacterias evidencia la existencia de una microbiota núcleo en tilapia; ésta fue encontrada en los tres tratamientos experimentales y se presenta en el 95% de las muestras analizadas. Los Phylum más representativos son: *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes Firmicutes*, las cuales estarían representando la microbiota núcleo. Las abundancia relativa está conformada por estas mismas bacterias, en orden descendente. Asimismo fue posible observar que en los resultados de las semanas dos y tres, las *Fusobacterias* son más abundantes en la mayoría de las muestras (Fig. 5).

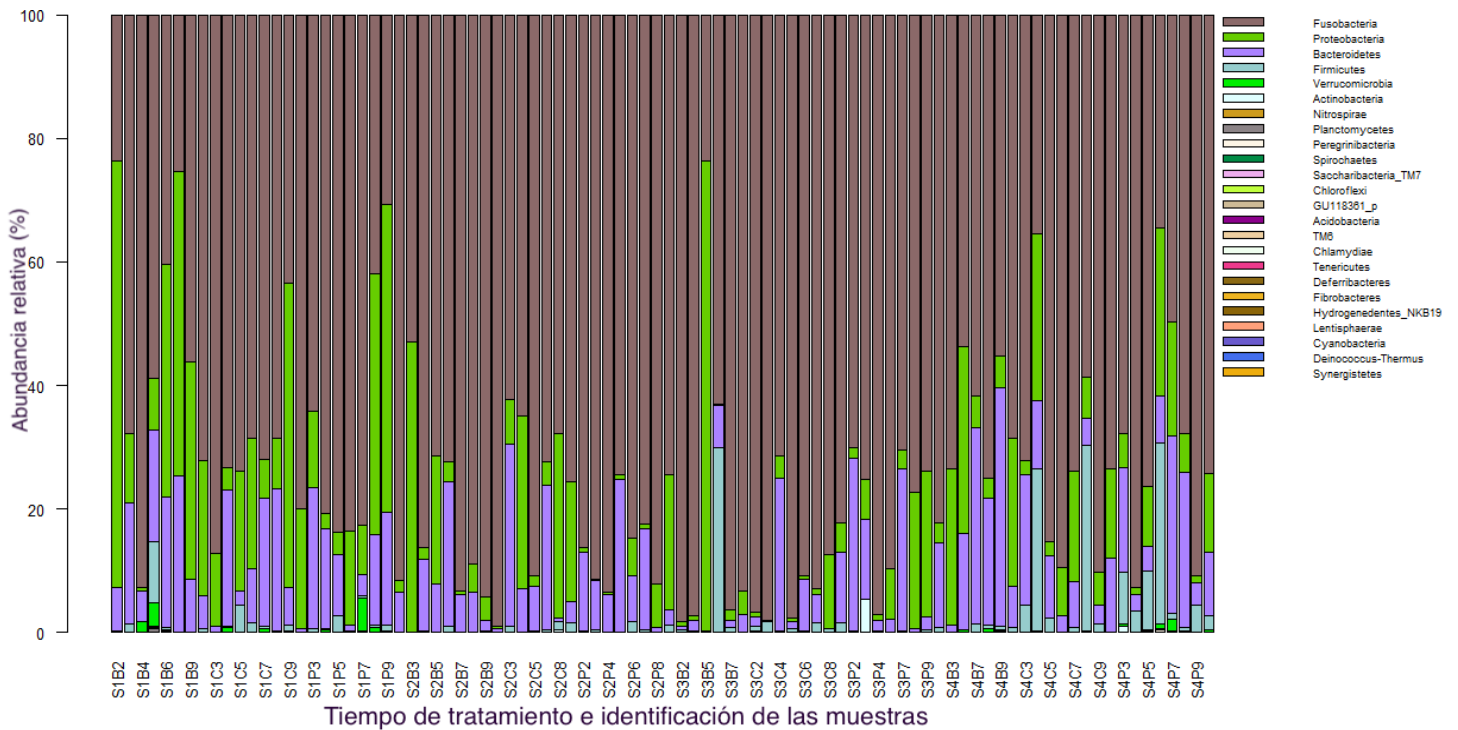


Figura 5. Abundancia relativa a nivel de Phylum de bacterias presentes en las heces de la tilapia, *O. niloticus*, alimentada con dos tratamientos con diferentes prebióticos ( $\beta$ -glucanos y pared celular de levadura) y un tratamiento control sin aditivos, durante cuatro muestreos semanales progresivos. S= semana de tratamiento, B=  $\beta$ -glucanos, C= grupo control y P= pared celular.

Al realizar el análisis de la microbiota intestinal de la tilapia (*O. niloticus*) a nivel de género, se puede diferenciar una riqueza de bacterias comunes en todas las muestras sin efecto del tratamiento experimental. Los tres géneros de bacterias más abundantes fueron: *Fusobacteria*, con 51% de las lecturas, seguido de *Cetobacterium*, con 19% y *Aeromonas* con 4%; esta distribución se puede observar en más del 90% de las muestras analizadas (Fig. 6). Asimismo, es importante destacar la presencia de una microbiota núcleo que, aunque representa un porcentaje menor de la diversidad total, se distingue claramente. Esta microbiota núcleo que está presente en el 95% de las muestras se compone por GQ360012, GQ360021 (las cuales no están clasificadas a este nivel), *Cetobacterium*, *Fusobacteriaceae* y *Plesiomonas*.

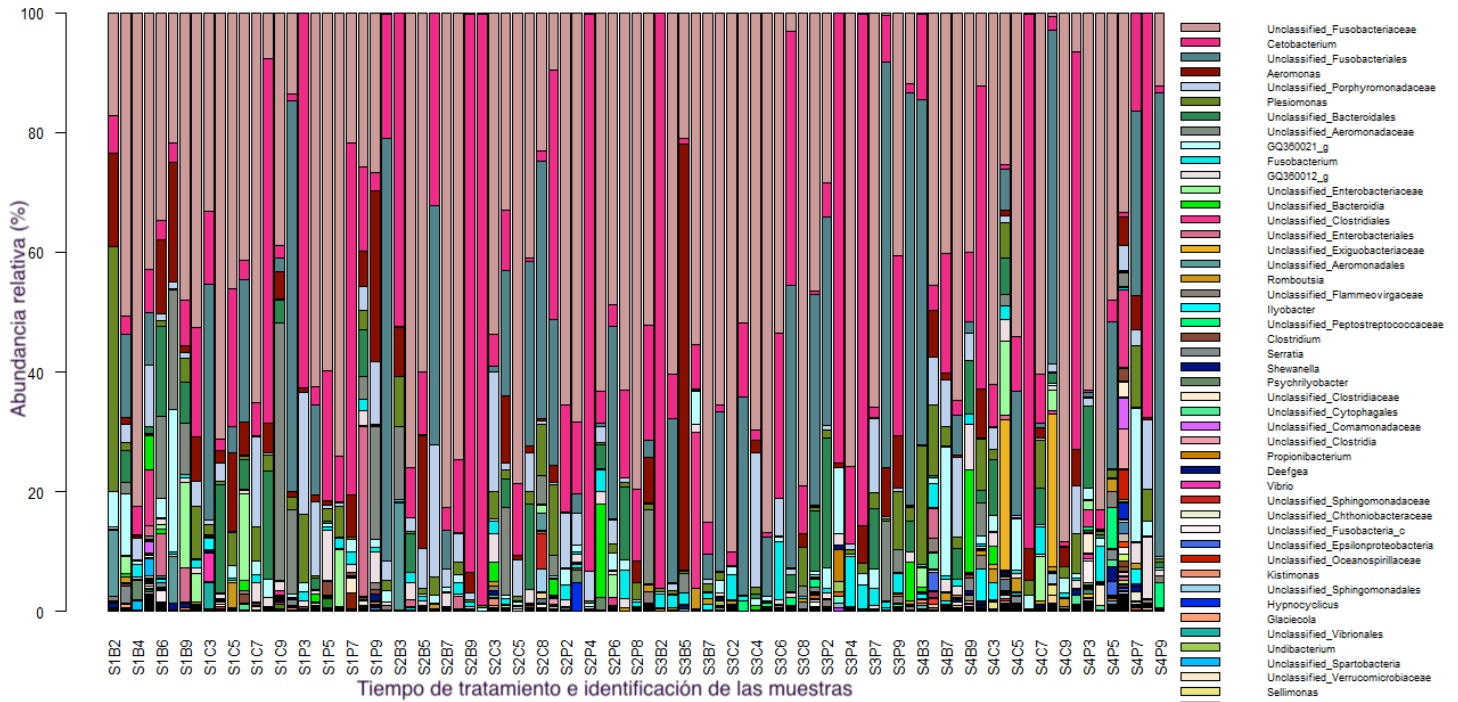


Figura 6. Abundancia relativa a nivel de género de bacterias presentes en las heces de la tilapia, *O. niloticus*, alimentada con dos tratamientos con diferentes prebióticos ( $\beta$ -glucanos y pared celular de levadura) y un tratamiento control sin aditivos, durante cuatro muestreos semanales progresivos. S= semana de tratamiento, B=  $\beta$ -glucanos, C= grupo control y P= pared celular.

La gráfica NMDs representa el total de las muestras tomadas durante los cuatro muestreos semanales, con las dietas que contenían  $\beta$ -glucanos, pared celular y el grupo control; es evidente que no existe un agrupamiento por tratamiento, y por el contrario, las muestras se presentan agrupadas sin diferenciación aparente (Fig. 7). Se observan muestras dispersas de diferentes tratamientos y también muestras agrupadas sin ninguna diferenciación aparente. El índice de Shannon resultante de este análisis fue de 2.2, que corresponde a lo descrito como una “diversidad normal”.

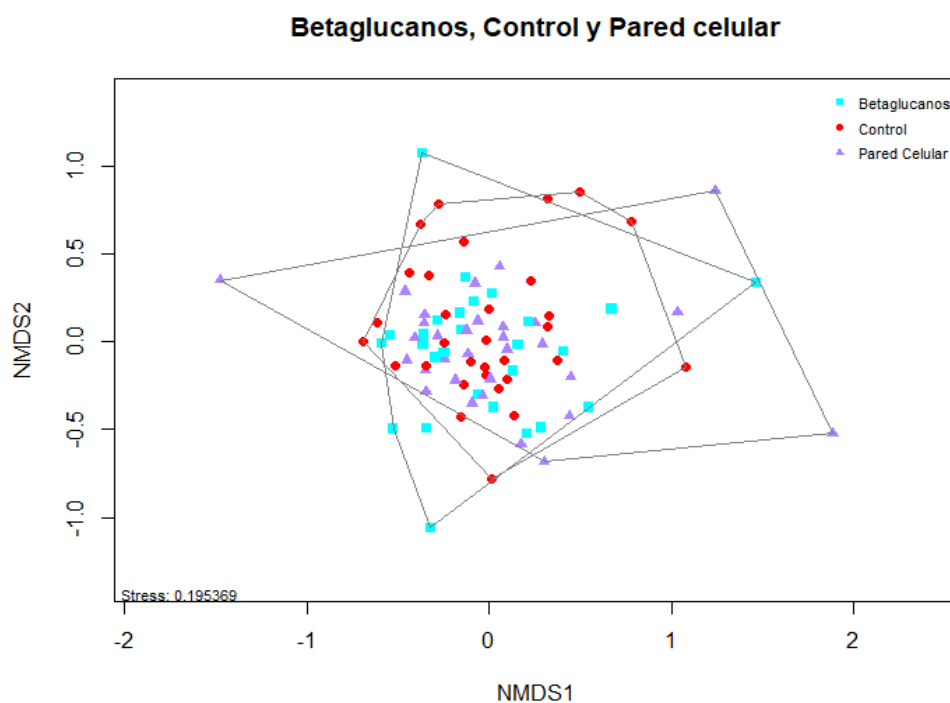


Fig. 7. Gráfica de escala multidimensional no métrica (NMDS) de microbiomas de muestras de heces de tilapia (*O. niloticus*) individuales alimentadas con dos tratamientos con diferentes prebióticos ( $\beta$ -glucanos y pared celular de levadura) y un tratamiento control sin aditivos, durante cuatro muestreos semanales progresivos. MDS1 y MDS2 representan los dos ejes del espacio de ordenación bidimensional. Cada punto representa el microbioma de un pez individual.

Para conocer la distribución temporal del microbioma intestinal de la tilapia con los tratamientos alimenticios, se hicieron gráficas de NMDs con los datos semanales de la microbiota intestinal. En los resultados correspondientes a la semana uno, no se observaron diferencias en cuanto a los grupos de bacterias residentes (Fig. 8A). Sin embargo, en los datos correspondientes a las semanas 2 y 3 fue posible

observar una modulación de la microbiota intestinal en comparación a la semana 1, siendo las muestras de los peces alimentados con prebióticos las más similares, y en contraste con el grupo control que se observa disperso y separado de los otros dos grupos (Fig. 8B). Los resultados del microbioma intestinal en la semana 4, al final del experimento, muestran que existe un agrupamiento similar al encontrado en la semana 1, pero distinguiendo más muestras dispersas (Fig. 8C).

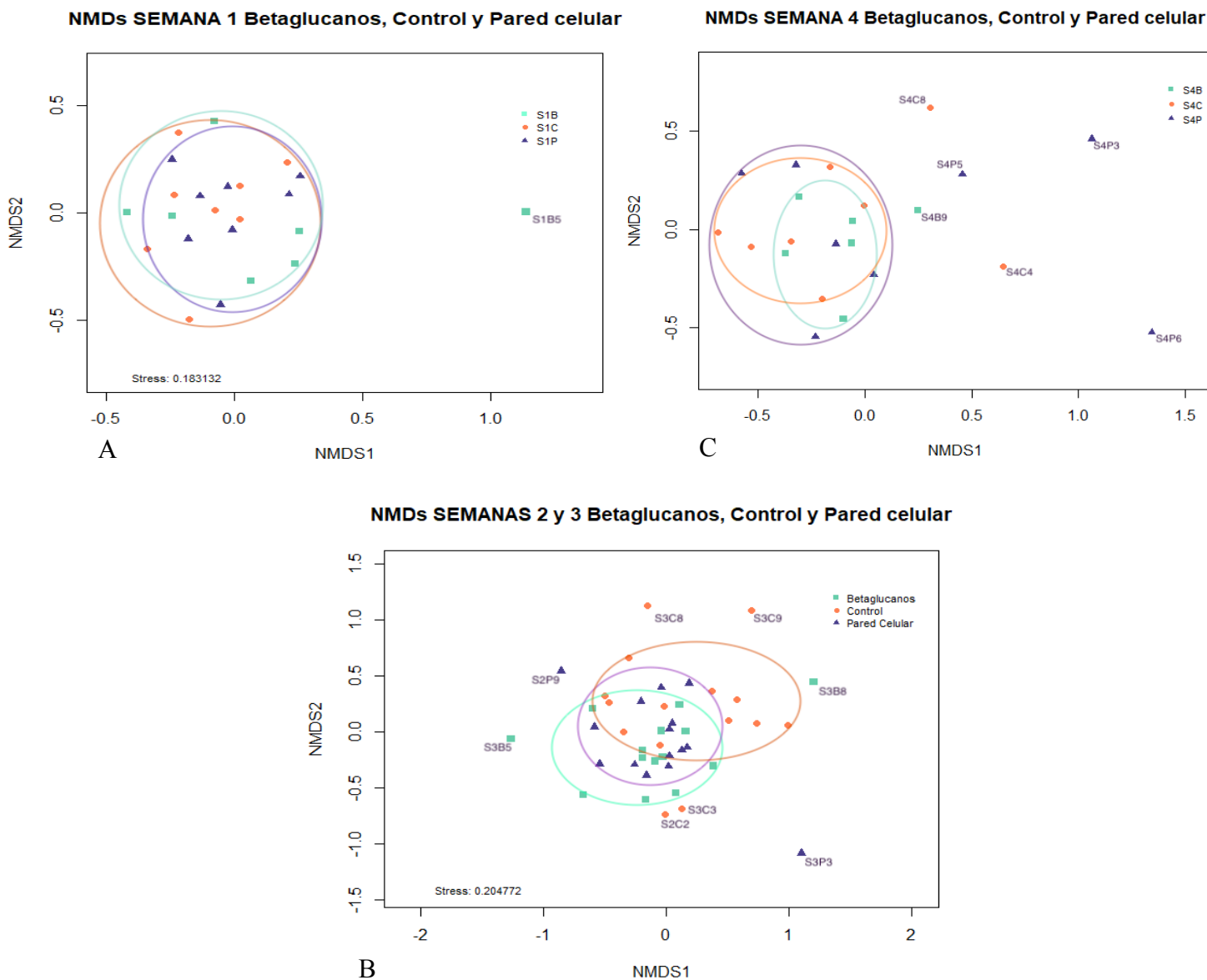


Fig. 8. Gráficas de escala multidimensional no métrica (NMDS) de microbiomas de muestras de heces de tilapia (*O. Niloticus*) individuales alimentadas con dos tratamientos con diferentes prebióticos ( $\beta$ -glucanos y pared celular de levadura) y un tratamiento control sin aditivos, MDS1 y MDS2 representan los dos ejes del espacio de ordenación bidimensional. Cada punto representa el microbioma de un pez individual. La gráfica (A) muestra una comparación de muestras durante la primera, (B) cuarta semana y (C) semana dos y tres del tratamiento.

## DISCUSIÓN

### *Desempeño en cultivo*

El uso de prebióticos en la dieta para peces ha sido un tema de estudio muy explorado en la última década. Existen diversas investigaciones que han demostrado un efecto positivo en el desempeño en cultivo de algunas especies (Li *et al.*, 2006; Hisano *et al.*, 2008; Kühlwein *et al.*, 2013; Mohammad *et al.*, 2015; Boonanuntanasarn, 2016; Pilarski, 2017;). En el presente trabajo se determinó el efecto del uso de los beta-glucanos aislados de la pared celular de levadura y para observar si tiene el mismo efecto que la pared celular de la levadura independiente o en su totalidad ya que ésta contiene  $\beta$ -glucanos y otras moléculas que ya se han relacionado de alguna forma con la nutrición animal, como son los oligo-mananos (Selim y Reda, 2015). En el presente trabajo, no se observaron efectos negativos por el uso de los prebióticos, tomando en cuenta la alta supervivencia registrada en todos los tratamientos.

En cuanto a la ganancia de peso, se observaron los mejores resultados en los peces que fueron alimentados con ambos prebióticos (pared y  $\beta$ -glucanos). Anteriormente se han encontrado resultados similares con el uso de  $\beta$ -glucanos (Dawood *et al.*, 2015; Pilarski *et al.*, 2107), y pared celular de levadura (Li *et al.*, 2006; Hisano *et al.*, 2008; Kühlwein *et al.*, 2013; Abu-Elala *et al.*, 2013; Mohammad *et al.*, 2015; Boonanuntanasarn, 2016; Li *et al.*, 2019). El efecto positivo que se observa en la ganancia de peso al final del experimento, señalan algunos autores, podría ser debido a que en etapas tempranas de desarrollo se reduce la inflamación del tracto intestinal promoviendo su crecimiento (Ai *et al.*, 2007; Aramli *et al.*, 2015).

Aunque en diferencia de peso no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con prebióticos, si fue posible encontrar diferencias entre los tratamientos cuando se evaluó el crecimiento longitudinal de los organismos experimentales. La longitud total obtenida en los peces alimentados con pared

celular y  $\beta$ -glucanos aislados fue similar pero mayor a la encontrada en el grupo control. Esto confirma nuevamente que el uso de prebióticos como estimulante del crecimiento de los peces es efectivo. Esto se encuentra en concordancia con lo observado en otros organismos acuáticos como camarón y peces incluyendo tilapia, (Hisano *et al.*, 2008; Kühlwein *et al.*, 2103; Mohammad *et al.*, 2015; Dawood *et al.*, 2015; Abu-Elala *et al.*, 2013; Selim y Reda, 2014; Pilarsky, 2017).

Una observación importante que relaciona el uso de prebióticos y la actividad acuícola, es lo encontrado con el registro del peso en canal. Al evaluar este parámetro productivo se encontró que con el uso de pared celular hubo un mayor incremento en el peso en canal, que con el uso del  $\beta$ -glucano aislado y en el grupo control. El peso en canal es un parámetro de suma importancia para evaluar el rendimiento de los sistemas de producción por que es el peso obtenido sin vísceras lo que representa en realidad el peso del producto que saldrá a la venta. No se encontraron publicaciones científicas que relacionen este parámetro productivo con el uso de prebióticos.

Lo anterior puede relacionarse directamente con el peso de las vísceras de los peces, así que se evaluó el peso de éstas y para obtener el porcentaje de grasa contenida en ellas. Los resultados indican que con el uso de pared celular se obtuvieron porcentajes de contenido de grasa más bajos, índice hepatosomático y viscerosomático más bajos, que con el uso de  $\beta$ -glucanos aislados e incluso que con el tratamiento control. Esto a su vez, es concordante con el porcentaje de lípidos obtenidos en el análisis bromotalógico de los organismos completos. La evidencia de que el uso de la pared celular de levadura afecta a la acumulación de grasa perivisceral es muy clara. En la literatura no se han registrado resultados en tilapia, ni en otros peces comerciales. Ésta información podría ofrecer otro panorama sobre la respuesta de la tilapia a la inclusión de prebióticos en las dietas, para lograr un mejor aprovechamiento de los nutrientes, con las implicaciones económicas que esto puede tener.



### *Microbiota intestinal*

El uso de prebióticos en las dietas para peces con el objetivo de modular la microbiota intestinal se ha popularizado, con la finalidad de aumentar la población de las bacterias benéficas que ayuden a obtener una acción más efectiva por parte del sistema inmune de los peces (Kühlwein *et al.*, 2103; Abu-Elala *et al.*, 2013; Selim y Reda, 2014; Mohammad *et al.*, 2015; Dawood *et al.*, 2015; Pilarsky, 2017), así como también para la mejora de su desempeño en cultivo. Existen algunos estudios publicados donde se describe la microbiota núcleo de cíclidos usando la técnica de secuenciación de gen 16S rRNA. La microbiota núcleo a nivel de Phylum está compuesta de: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Planctomcetes* y *Verrucomicrobia* (Tsuchiya *et al.*, 2007; Llewelyn *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2014; Baldo *et al.*, 2015; Egerton *et al.*, 2018). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, donde además se encontró al Phylum *Proteobacteria* como parte de la microbiota núcleo de la tilapia (encontrada en el 100% de las muestras).

Por otro lado, se registraron cuatro Phylum de bacterias presentes en el 80% de las muestras. Estas son: *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteriodetes*, este último Phylum presente en menor porcentaje cuando se presenta junto con el género *Cetobacterium* en el microbioma de un organismo. Esta modulación puede estar dada por la dieta (Hao *et al.*, 2017), y resulta interesante porque el Phylum *Bacteriodetes* está relacionado con la fermentación de carbohidratos mientras que el género *Cetobacterium* se relaciona con la producción de vitamina B12 (Tsuchiya *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2016).

Los resultados de la abundancia del microbioma a nivel de género encontrados en el presente trabajo, son similares a los reportados para otras especies de peces incluyendo a la carpa (*Cyprinus carpio*), bagre (*Ictalurus punctatus*) (Larsen *et al.*, 2014). *Cetobacterium* se presenta en el 100% de las muestras analizadas, este género ya ha sido reportado como el más abundante en estudios previos con

tilapia, pero también en otros peces de agua dulce, como paiche (*Arapaima Gigas*), carpa (*Cyprinus carpio*), bagre (*Ictalurus punctatus*), salmón (*M. salmoides*) (Romero *et al.*, 2006; Kessel *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2108), además, como se mencionó anteriormente, se ha descrito que este género está relacionado con la producción de vitamina B12 (Tsuchiya *et al.*, 2007). Aunque la tilapia no necesita la inclusión de vitamina B12 (FAO, 2020) esta información sobre las bacterias presentes puede estar directamente relacionada con su producción, ya que pueden dar indicios sobre los requerimientos nutricionales de la especie, así como de las posibles consecuencias sobre la regulación de *Cetobacterium* por la dieta.

Aunque existen algunos reportes acerca del microbioma intestinal de la tilapia y su modulación a través de algunos ingredientes, hasta la fecha no existen investigaciones publicadas en donde se evalúe el efecto temporal de la administración de prebióticos en la microbiota intestinal.

En el presente trabajo fue posible observar que, en un margen de dos semanas de alimentación, ocurrieron cambios y modificaciones en la microbiota intestinal de la tilapia que pueden estar impactando de diferentes formas, ya sea a nivel metabólico (como la relación entre *Bacteroidetes* y el metabolismo de los carbohidratos en los peces), o bien posiblemente coadyuvando en la expresión de algunos genes. Se ha reportado que los genes tienen efectos sobre la microbiota de peces (Li *et al.*, 2018), de hecho algunos trabajos han revelado que, diferente colonización en la microbiota es resultado de genotipos diferentes del huésped (Smith *et al.*, 2015). Un análisis transcriptómico a las dos semanas de tratamiento, permitiría conocer si existe una activación o inactivación de genes debido a la suplementación con prebióticos.

## CONCLUSIONES

-El desempeño en cultivo de la tilapia es mejor con el uso de pared celular de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, basado en una mayor ganancia de peso y talla de los organismos.

-Se obtienen organismos con menor porcentaje de grasa total corporal y un menor índice viscerosomático.

-La microbiota núcleo en el 95% de las muestras a nivel de Phylum, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* concuerda con la reportada por otros autores en tilapia. Mientras que, a nivel de género en el 100% de las muestras, fue *Cetobacterium*, bacteria con importancia en la producción de vitamina B12.

-Existe un cambio de la microbiota intestinal como respuesta a la suplementación con prebióticos como pared celular de levadura y  $\beta$ -glucanos aislados. Este cambio inicia a partir de la segunda semana y continúa hasta la tercera, estabilizándose, de manera similar en todos los tratamientos, durante la cuarta semana.

-Es necesario realizar otros análisis a nivel transcriptómico para observar los cambios que ocurren durante las dos semanas con mayor diferencia en la microbiota intestinal de la tilapia.

## REFERENCIAS

- Abass, D., Obirikorang, K., Campion, P., Edeiyie, R., Skov, P. 2018. Dietary supplementation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) improves growth stress tolerance and disease resistance in juvenile Nile Tilapia (*O.N*). *Aquacult Int* (2018) 26:843-855
- Abu-Elala, N., Marzouk, M., Moustafa, M. 2013. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. Cairo University 1,21-29.
- Alessandro Del' Duca, Dionéia Evangelista Cesar, Claudio Galuppo Diniz, Paulo César Abreu. 2013. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. 388-39.
- A.O.A.C., Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17 th Edition. Washington, E. U. A (2000) p.1018.
- Ayodeji, A, Rungtawan, Y, Alexander, J, Ana, R, Daniel, L. M, Simon, J, Davies, T. 2016. Combined effect of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. 61-70, 463.
- Balcázar, J., Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunnigham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J., 2006. The role of probiotic in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, 173–186.
- Baldo L, Riera JL, Tooming-Klunderud A, Alb\_a MM, Salzburger W 2015. Gut microbiota dynamics during dietary shift in Eastern African cichlid fishes. *PLoS ONE* 10: e0127462.
- Banerjee, G.; Mukherjee, S.; Bhattacharya, S.; Ray, 2016. A. Purification and characterization of extracellular protease and amylase produced by the bacterial strain, *Corynebacterium alkanolyticum* ATH3 Isolated from Fish Gut. *Arab. J. Sci. Eng.* 41, 9–16.
- Banerjee, G., & Ray, A. K. 2017. Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis*, 72(1), 1-11.
- Boonanuntanasarn, S., Wongsasak, U., Pitaksong, T., Chaijamrus, S., 2015. Effects of dietary supplementation with  $\beta$ -glucan and synbiotics on growth, haemolymph chemistry, and intestinal microbiota and morphology in the Pacific white shrimp <https://doi.org/10.1111/anu.12302>
- Brunvold, L., Sandaa, R. A., Mikkelsen, H., Welde, E., Bleie, H., & Bergh, Ø. (2007). Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture*, 272(1-4), 319-327.
- Burr G, D Gatlin III & S Ricke. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotic in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture society* 36(4): 425-436.
- Cerf-Bensussan, N., & Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes?. *Nature Reviews Immunology*, 10(10), 735-744.
- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Allad D. 2007 A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria *J Microbiol Methods*.2007 May; 69(2): 330-339.doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005

Carbone D, Faggio C. 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. Elsevier. Journal Fish & Shellfish Immunology 54(2016)172-178.

Chen, K.-L.; Weng, B.-C.; Chang, M.-T.; Liao, Y.-H.; Chen, T.-T.; Chu, C., 2008. Direct enhancement of the phagocytic and bactericidal capability of abdominal macrophage of chicks by  $\beta$ -1,3-1,6-glucan. Poultry Science 87, 2242–2249.

CONAPESCA 2008 "Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2008". Mazatlán, Sin, México  
Dawood, M.; Koshio, S.; Ishikawa, M.; Yokoyama, S. 2015. Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and  $\beta$ -glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major* Fish & Shellfish Immunology 45 (2015) 33-42.

García, E., López. M., Lizárraga. C., 2016 Nuevo León, San Nicolás de Lo Garza, Nuevo León, México, pp. 570-581. ISBN 978-607-27-0822-8.

Escobar, B., Olvera, M., Puerto, C. 2006 Avances sobre la Ecología Microbiana del tracto digestivo de la Tilapia y sus Potenciales Implicaciones. Avances en nutrición acuícola VIII. VII Simposium Internacional de nutrición acuícola. Monterrey Nuevo León. ISBN 970-694-333-5

Gómez-Gil, Enciso-Ibarra, Cruz-Suárez, Hernández. 2017. Efecto de la dieta en el microbioma intestinal de organismos acuáticos. Avances en Nutrición acuícola. ISBN 978-607-27-0822-8.

FAO, OMS. 2002. Probióticos en los alimentos, propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Londres. 2 pp.

FAO. 2016. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma. 224 pp.

FAO, 2020. Sistema de Información sobre Alimentos y Recursos Fertilizantes para la Acuicultura, Tabla. Resumen de los requerimientos de nutriente (vitaminas y minerales) en la dieta de la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (% porcentaje de alimento seco excepto donde se menciona otra cosa)

F. Pilarski, C. Alberto Ferreira, F. Brito, F. Sabbadin. 2017 Different  $\beta$ -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. Fish & Shellfish Immunology 70 (2017). 25-29.

Ganguly S, Prasad A. 2012 Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism: a review. Rev Fish Biol Fish 22:11-16.

Gatlin III DM, P Li, X Wang, GS Burr, F Castille & AL Lawrence. 2006. Potential application of prebiotics in aquaculture. In: Cruz E, D Ricque, M Tapia, MG Nieto, DA Villarreal, AC Puello & A García (eds). Avances en nutrición acuícola VIII. VIII Simposium I de Nutrición Acuícola, pp. 371-376. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.

Gibson GR, Roberfroid MB 1995 Dietary modulation of human colonic microbiota, introducing the concept of prebiotics. J Nutr 125:1401–1412

Hahn-Von-Hessberg, C.M., Quiroz-Bucheli, A. & Grajales-Quintero, a., 2014.- Caracteres hematológicos en individuos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Trewavas 1983) con pesos entre 50-150 g y 150-250 g, Estación Piscícola, Universidad de Caldas, Colombia. Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. de Caldas, 18 (1): 142-157.

Hao, Y.; Wu, S.; Xiong, F.; Tran, N.; Jakovlić, I.; Zou, H.; Xiang, W.; Wang, G. 2017 Succession and fermentation products of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) hindgut microbiota in response to an extreme dietary shift. Front. Microbiol., 8, 1585. [CrossRef] [PubMed]

H. Kuhlwein, D. L. Merrifield, M. D. Rawling, A. D. Foey and S. J. Davies. 2013. Effects of dietary  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 98 (2014) 279–289.

Jatobá, A., Vieira, F., Buglione-Neto, C., Mouriño, J., Silva, B., Seiffter, W., Andreatta, 2011. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiology and Biochemistry* 37, 725–732.

..... Khaled M. Selim & Rasha M. Reda 2015 Beta-Glucans and Mannan Oligosaccharides Enhance Growth and Immunity in Nile Tilapia, *North American Journal of Aquaculture*, 77:1, 22-30, DOI: 10.1080/15222055.2014.951812

Lauridsen, J. H.; Buchmann, K., 2010: Effects of short- and long-term glucan feeding of rainbow trout (*Salmonidae*) on the susceptibility to *Ichthyophthirius multifiliis* infections. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria* 40, 61–66.

Li, J.; Li, D. F.; Xing, J. J.; Cheng, Z. B.; Lai, C. H., 2006: Effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 84, 2374–2381.

Limmin Fan, Jiazhang Chen, Shunlong Meng, Chao Song, Liping Qiu, Gengdong H, Pao Xu. 2017. Characterization of microbial communities in intensive GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) pond systems during the peak period of breeding. 48, 459-472.

Chen, L.; Li, E. 2019 Beneficial effects of dietary  $\beta$ -glucan on growth and health status of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Fish and Shellfish Immunology* 91 (2019) 315–324

LI, P.; GATLIN III, D.M. 2003 Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture**, v. 219, p. 681-692.

Van Kessel, M.A.; Dutilh, B.E.; Neveling, K.; Kwint, M.P.; Veltman, J.A.; Flik, G.; Jetten, M.S.; Klaren, P.H.; den Camp, H.J.2004. Pyrosequencing of 16s rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). *AMB Express* , 1, 41.

Mohammad S. A., Behzad K., Rajab M. N. 2015. Effects of dietary  $\beta$ -glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 606-610.

Mojica, S. F., Vivanco, M., Martínez, C. J., Trujillo, R., 2010. Tilapia 2020: Prospectivo del sistema-producto nacional de tilapia en México. Comité Sistema Producto Tilapia de México, A. pp. 21- C. Mazatlan Sinaloa.

Nayak SK. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* 41: 1553-1573

Rawls JF, BS Samuel & JI Gordon. 2004. Gnotobiotic zebra fish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States* 101: 4596-4601.

Olivar M, Quintana M, Salabarría R. 2008 Componentes de la pared de las levaduras: actividad probiótica. CD de monografías Universidad de Matanzas Cuba.

lang, S., & Pedro, R. 2012. Imunoestimulantes em teleósteos: Probióticos, Beta-glucanas e LPS. *Orinoquia*, 16(1), 46-62.

Peng, L., & Gatlin III, D. M. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, 231, 445-456.

Pilarski, F., Olivera, C., Souza, F., Zanuzzo, F. 2017. Different  $\beta$ -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile Tilapia. *Fish and Shellfish Immunology*. 70(2017) 25-29.

Q. Ai\*, K. Mai, L. Zhang, B. Tan, W. Zhang, W. Xu, H. Li 2007. Effects of dietary  $\beta$ -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* *Fish & Shellfish Immunology* 22 2007 394-402

Rastall, R.A. (2004) Bacteria in the gut: friends and foes and hot to alter the balance. *J. Nutr.*, 134, 2022s–2026s.

Rekecki A, K Dierckens, S Laureau, N Boon, P Bossier & W Van den Broeck. 2009. Effect of germ-free rearing environment on gut development of larval sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 293: 8-15.

Ringø E, RE Olsen, TO Gifstad, RA Dalmo, H Amlund, GI Hemre & AM Bakke. 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 16: 117-136.

Ringø, E., & Birkbeck, T. H. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture research*, 30(2), 73-93.

Roberfroid, M. 2007 Effects of probiotics and prebiotics, Prebiotics: The concept Revisited. *J Nutr.* 137:830S-837S.

Romero, J.; Ringo, E.; Merrifield, D.L. 2014. The gut microbiota of fish. In *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 1st ed.; Merrifield, D.L., Ringo, E., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, UK.; pp. 75–100, ISBN 9780470672716.

Romero, J.; Navarrete, P. **2006**. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microb. Ecol.*, 51, 422–430. [CrossRef] [PubMed]

Shoemaker C.A., D.-H. Xu, J.J. Evans, P.H. Klesius. 2006. Parasites and diseases. C. Lim, C.D. Webster (Eds.), *Tilapia: Biology, Culture and Nutrition*. Haworth Press, Binghamton, NY , pp. 561–582.

Siwicki, A. K.; Zakes, Z.; Terech-Majewska, E.; Kazun, K.; Lepa, A.; Glabski, E., 2010: Dietary Macrogard reduces *Aeromonas hydrophila* mortality in tench (*Tinca tinca*) through the activation of cellular and humoral defence mechanisms. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20, 435–439.

Tapia- Paniagua. S. T. Chabrillon, M., Diaz-Rosales. P. de la banda, I.G., Lobo, C. Balebona, M.C, Morigino. M. A. 2010. Intestinal microbiota diversity of the fish

Vázquez, Govea, García, Solorio, Ríos-Durán, Campos-Mendoza, y Fonseca-Madrigal. 2016. Performance of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets with a feed additive based on organic Selenium (Se) and yeast cell Wall. VII Congreso Latinoamericana de Nutrición Animal. AMENA.

Michl SC, Ratten J-M, Beyer M, Hasler M, LaRoche J, Schulz C 2017 The malleable gut microbiome of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Diet-dependent shifts of bacterial community structures. *PLoS ONE* 12(5): e0177735.

Zekovic, D. B.; Kwiatkowski, S.; Vrvic, M. M.; Jakovljevic, D.; Moran, C. A. 2005: Natural and modified (1–3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 205–230.

## ANEXOS

### 1.-METODOLOGÍA CTB

El método CTAB, consiste en los siguientes pasos:

- Colocar las muestras en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml, agregar 480  $\mu$ L de EDTA 0.5 M y 120  $\mu$ L de lisozima,
- incubar a 37°C por 30 min, posteriormente centrifugar por 2 min a 15,000 rpm,
- Una vez realizado lo anterior tirar el sobrenadante, agregar 350  $\mu$ L de buffer CTAB a cada tubo,
- agregar 20  $\mu$ L de proteinasa K en una concentración de 20 mg/mL y agitar brevemente,
- Colocar los tubos en un termoblock a 55°C hasta que el tejido este lo suficientemente digerido.
- Agregar 300  $\mu$ L de LiCl 5M, 5  $\mu$ L de RNAsa y agitar por un minuto; posteriormente agregar 600  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitar brevemente, agitar la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente.
- Extraer 500  $\mu$ L de la capa acuosa (parte superior) del centrifugado y transferir a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL.
- Añadir 50  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 ml de Etanol 100% FRI; agitar y colocar a -20°C toda la noche.
- Centrifugar durante 20 min a 13,000 rpm a 4°C y retirar el sobrenadante cuidadosamente para no perder el ADN sedimentado.
- Agregar 750  $\mu$ L de etanol al 70%, agitar por 15 min a temperatura ambiente,
- Enseguida centrifugar a máxima velocidad (14,000 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente y retirar el sobrenadante por decantación,
- Secar el pellet de ADN en una campana de flujo laminar, una vez seco,



- Añadir 20  $\mu$ L de agua de 18 $\Omega$  estéril a temperatura ambiente para resuspender el pellet, mediante pipeteo.
- Calentar los tubos a 95°C por 5 minutos e inmediatamente colocar en hielo, para medir su pureza y concentración.
- El ADN resuspendido se guarda a -20°C.

Tabla de los reactivos que se necesitan en el método de extracción por CTAB

Cloruro de litio	AM9480	Thermofisher	2	100ml
RNAasa A	12091-021	Purelink	1	10ml
Lisozima	41805	Norgen Brotek Corp	1	5g
Etanol	13397EJ	Sigma-Aldrich	1	500ml
Proteínasa K	4333793	Invitrogen	1	5ml

## Anexo 2

### PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN

Las secuencias generadas por Illumina generalmente son pareadas (pair-end), se tienen dos secuencias para la misma molécula de ADN, una 3' -> 5' y la otra 5' -> 3'. Además, el equipo genera una carpeta por muestra con ambas secuencias comprimidas llamadas:

-nombre\_muestra\_L001\_R1.fastq.gz y nombre\_muestra\_L002\_R2.fastq.gz

Incluso, cada carpeta puede incluir otras subcarpetas con otra información y las secuencias dentro de una subcarpeta llamada Files.

Es necesario, descomprimirlas, limpiarlas, ensamblarlas y convertirlas a fasta; para cada muestra. Para realizar esto tenemos el script **pair-end\_cleaner.sh** que hace todo esto para cada una de las muestras (carpetas o subdirectorios) en un directorio, siempre y cuando las secuencias estén directamente dentro de la carpeta de cada muestra y no en subcarpetas dentro de la carpeta, como se muestra a continuación:

```
.
├── sample1
│   ├── sample1_L001_R1_001.fastq.gz
│   └── sample1_L001_R2_001.fastq.gz
├── sample2
│   ├── sample2_L001_R1_001.fastq.gz
│   └── sample2_L001_R2_001.fastq.gz
└── sample3
    ├── sample3_L001_R1_001.fastq.gz
    └── sample3_L001_R2_001.fastq.gz
```

Este script está destinado a procesar rápidamente muchos archivos fastq sin ningún comando adicional y producir archivos fasta listos para análisis posteriores, como el filtrado de quimeras y la clasificación de taxones, el proceso que realiza

este script es el siguiente, comienza por descomprimir y busca adaptadores, a continuación limpia las secuencias (Q20), quita “n”, elimina bases más allá de 150 para química de 2x150, elimina secuencias cortas (<110) ensambla ambas secuencias apareadas en una sola con PEAR y las convierte en fasta, es importante mencionar que esta limpieza esta diseñada para la región V3, V4, y V3-V4 del 16S rRNA.

Se continuó con la descontaminación, ya que es probable que existan secuencias contaminantes, no 16S rRNA, como producto de varios factores. Es aconsejable eliminar estas secuencias contaminantes antes de continuar con los análisis para no introducir errores y reducir el tiempo de procesamiento de los datos. Las secuencias contaminantes pueden ser: Quimeras, secuencias eucarióticas, humanas, virales, 18S ribosomal o 16S (mitocondrial/cloroplastos). La limpieza más importante en este tipo de análisis son las quimeras, ya que durante el proceso de amplificación por PCR se pueden producir secuencias que no son productos reales de la amplificación del gen 16S (secuencias quiméricas), por lo tanto es necesario eliminarlas, para esto se utiliza el programa VSEARCH usando como referencia un set de secuencias estándar como SILVA 128, este proceso se corre mediante el script chimera\_detector.sh que produce un reporte y nuevos archivos multifasta, de los ya se ha eliminado las secuencias quiméricas, y pueden ser usados para los subsecuentes análisis (QIIME o clasificación por RDPR o mg\_classifier), este último fue el utilizado ya que elimina singletons (secuencias únicas), clasifica a todos niveles, desde especie hasta phylum, es rápido, clasificar, 16S con diferentes bases de datos y calculo índices de diversidad alfa y beta. El script genero varios archivos: tabla tipo excel (otus.tsv) con los resultados, tabla para usar con STAMP (Bacteria.spf o Eukaryota.spf), clasificación solo hasta género (genus.tsv), tabla con los números de secuencias por taxón (OTUs\_taxon.tsv), archivo con muestras primero y luego la taxonomía, útil para usar con KRONA (samples-tax.tsv), subdirectorío (diversity) con los archivos de diversidad alpha.txt, beta.bray\_curtis.sorted.txt, beta.bray\_curtis.tree,

beta.bray\_curtis.txt, otus.txt, rare.txt, archivo log (mg\_classifier.log) y un reporte (mg\_classifier.report), todo esto se clasificó con la base de datos, EzBioCloud-1.5