

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Estudio sobre la fisiología térmica, metabolismo respiratorio y
nutrición de *Seriola lalandi***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Presenta:

Ernesto Larios Soriano

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Ernesto Larios Soriano

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Denise Re Araujo
Codirectora de tesis

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Codirector de tesis

Miembros del Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Salas

Dr. Leonardo Ibarra Castro



Dr. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Biotecnología Marina

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Ernesto Larios Soriano © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta Ernesto Larios Soriano como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Estudio sobre la fisiología térmica, energética y nutricional de *Seriola lalandi*

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Denise Re Araujo
Codirectora de tesis

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Codirector de tesis

Seriola lalandi es un pez que se cultiva en jaulas flotantes en la costa del Pacífico mexicano donde la temperatura fluctúa entre 15 °C y 28.5 °C durante todo el año; no obstante, los efectos de la temperatura regional en su fisiología y metabolismo aún se desconocen. Este trabajo determinó el efecto de la temperatura en la fisiología térmica, en el metabolismo respiratorio, en la nutrición y la microbiota intestinal de juveniles de la especie *Seriola lalandi*. Los juveniles (N = 350) se aclimataron a 20, 23, 26, 29 y 32 °C, respectivamente durante 21 días. La temperatura final preferida fue de 26 °C, la tasa metabólica de rutina aumentó de 390.06 mg O₂Kg⁻¹h⁻¹ a 468.77 mg O₂Kg⁻¹h⁻¹ en el rango de temperatura de aclimatación de 20 a 29 °C y finalmente disminuyó a 423.00 mg O₂Kg⁻¹h⁻¹ a 32 °C, se obtuvieron valores de cociente de temperatura (Q₁₀) de 1.17, 1.00, 1.56 y 0.70. Las temperaturas críticas máximas (TCMax) fueron de 34.2 a 36.9 °C, mientras que las temperaturas críticas mínimas (TCMin) fueron de 10.9 a 17.3 °C. La tasa de respuesta de la aclimatación (ARR) fue de 0.22 a 0.62. Con los valores TCMax y TCMin, se construyó una ventana térmica con un área de 258 °C². Con el método de Chase y TIRM se obtuvo en *S. lalandi* un alcance aeróbico máximo en 26 °C con ambos métodos. Finalmente, en este estudio se analizó el efecto de la dieta y la temperatura en el crecimiento y en la diversidad de la microbiota fecales en los juveniles de *Seriola lalandi*. Los juveniles se aclimataron a 20 °C y 26 °C durante 30 días; asimismo, los peces fueron alimentados con tres dietas con tres niveles de inclusión de lípidos (7%, 14% y 21%). El máximo crecimiento se observó en la temperatura de 20 °C con 14% de inclusión de lípidos y a 26 °C con la dieta de 21% de inclusión de lípidos. La microbiota fecal de *S. lalandi* se caracterizó utilizando la secuenciación de alto rendimiento basado en la región V3 del gen 16S rRNA. Se observó un cambio significativo en la microbiota fecal en relación con la temperatura de aclimatación. Los resultados indicaron que la riqueza de especies se modificó en relación con las temperaturas experimentales. Con los resultados en este trabajo, se puede confirmar que las temperaturas óptimas para el desempeño fisiológico y metabólico de *S. lalandi* son de 23 a 26 °C, además se demostró la importancia de la temperatura ambiental y los componentes de la dieta para mantener el crecimiento y un equilibrio en la microbiota intestinal.

Palabras clave: *Seriola lalandi*, Termorregulación, Tolerancia térmica, Nutrición, Metagenómica 16S RNAr

Abstract of the thesis presented by **Ernesto Larios Soriano** as a partial requirement to obtain the Doctor of Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology

Study on the thermal, energetic and nutritional physiology of *Seriola lalandi*

Abstract approved by:

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Thesis Codirector

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Thesis Codirector

Seriola lalandi is a fish farmed in the Mexican Pacific coast where the temperature fluctuates from 15 to 28.5 °C throughout the year; however, the effects of regional temperature on their physiology and metabolism are still unknown. This work determined the effect of temperature on the thermal physiology, respiratory metabolism, nutrition and intestinal microbiota of juveniles of the species *Seriola lalandi*. The juveniles (N = 350) were acclimated at 20, 23, 26, 29 and 32 °C, respectively, for 21 days. The preferred final temperature was 26 °C, the routine metabolic rate increased from 390.06 mg O₂Kg⁻¹h⁻¹ to 468.77 mg O₂Kg⁻¹h⁻¹ in the acclimation temperature range from 20 to 29 °C and finally decreased to 423.00 mg O₂Kg⁻¹h⁻¹ at 32 °C, the temperature quotient (Q₁₀) of 1.17, 1.00, 1.56 and 0.70 was obtained. The critical temperature maximum (CTMax) were from 34.2 to 36.9 °C, while the critical temperature minimum (TCMin) were from 10.9 to 17.3 °C. The acclimation response rate (ARR) was 0.22 to 0.62. With the CTMax and TCMin values, a thermal window was built with an area of 258 °C². With the Chase and TIRM methods, a maximum aerobic scope at 26 °C was obtained in *S. lalandi* juveniles. Finally, in this study, the effect of diet and temperature on the growth and diversity of faecal microbiota in *S. lalandi* juveniles was analyzed. The juveniles were acclimated at 20 °C and 26 °C for 30 days; In addition, the fish were fed three diets with three levels of lipid inclusion (7%, 14% and 21%). The maximum growth was observed in the temperature of 20 °C with 14% inclusion of lipids and at 26 °C with the diet of 21% of inclusion of lipids. Faecal microbiota in *S. lalandi* was characterized using high-throughput sequencing approach based on the V3 region of the 16S rRNA gene. A significant change in fecal microbiota was observed in relation to acclimation temperature. The results indicated that the species richness was modified in relation to the environmental temperatures. With the results in this work, it can be confirmed that the optimal temperature for the physiological and metabolic performance of *S. lalandi* is from 23 to 26 °C, besides the importance of the environmental temperature and the components of the diet to maintain the growth and a balance in the intestinal microbiota.

Keywords: *Seriola lalandi*, Thermoregulation, Thermal tolerance, Nutrition, Metagenomics 16S RNAr

Dedicatoria

A MIS PADRES:

SRA. MARGARITA SORIANO OLIVARES

SR. JUVENTINO LARIOS SALGUERO

Por el amor incondicional y las enseñanzas
que me brindan en todo momento

A MI HERMANO

JAVIER LARIOS SORIANO

Por ser una motivación y orgullo

A MI ESPOSA E HIJA

LAURA LILIANA LÓPEZ GALINDO

ZYANYA LILIAN LARIOS LÓPEZ

Por su amor, apoyo y paciencia a lo largo de estos cuatro años

Agradecimientos

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los recursos de manutención otorgados a lo largo de los cuatro años de doctorado, así mismo por las diferentes becas otorgadas para las estancias académicas a las que pude acudir.

Agradecimiento al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California por brindarme los medios académicos necesarios para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

A mis directores de tesis, la Doctora Ana Denisse Re Araujo y al Doctor Dariel Tovar Ramírez por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos al desarrollar esta tesis y por su apoyo profesional y personal en todo momento.

A los miembros del comité de tesis, a la Doctora Clara Elizabeth Galindo Sánchez, al Doctor Leonardo Ibarra Castro y al doctor Bruno Gómez Gil Sala Rodríguez por sus acertados comentarios y sugerencias, así como por brindarme su apoyo para realizar esta tesis.

A el grupo de Fisiología Integrativa de Organismos Marinos, el Doctor Fernando Díaz Herrera, el Ingeniero Ernesto Lerma por su apoyo a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes	3
1.1.1. <i>Seriola lalandi</i>	3
1.1.2. Biología térmica de peces	4
1.1.3. Tasa metabólica	5
1.1.4. Nutrición de organismos marinos	6
1.1.5. Importancia de la microbiota intestinal en Peces.....	7
1.1.6. Metagenómica	8
1.2. Justificación	9
1.3. Hipótesis.....	9
1.4. Objetivos	10
1.4.1. Objetivo General	10
1.4.2. Objetivos Particulares	10
Capítulo 2. Metodología.....	11
2.1. Obtención de organismos	11
2.2. Biología térmica.....	11
2.2.1. Preferencia térmica a través del método gravitacional y el método aguda.....	11
2.2.2 Temperaturas críticas.....	13
2.3 Respuestas metabólicas	14
2.3.1 Tasa de respiración	14
2.3.2. Campo de actividad metabólica.....	16
2.3.3. Alcance aeróbico “Chase”	17
2.4. Nutrición.....	17

2.4.1. Formulación de dietas	17
2.4.2. Ensayos de nutrición bajo temperaturas óptimas y sub-óptimas.....	19
2.4.3. Tasa metabólica postprandial, excreción de amonio y razón atómico O:N.....	20
2.4.4. Índices de crecimiento	21
2.5. Análisis de la microbiota intestinal de <i>Seriola lalandi</i>	21
2.5.1. Amplificación por PCR del gen 16S rRNA y secuenciación	22
2.5.2. Análisis bio-informático	23
2.6. Estadística.....	24
Capítulo 3. Resultados.....	25
3.1. Biología térmica.....	25
3.1.1. Preferencia térmica en un ciclo circadiano	25
3.1.2. Preferendum térmico determinado a través el método agudo.....	26
3.1.3. Tolerancias térmicas	27
3.2. Respuestas metabólicas	28
3.2.1. Tasa respiratoria bajo las temperaturas de aclimatación	28
3.2.2. Alcance aeróbico	29
3.3. Efecto de la aclimatación térmica en el crecimiento	30
3.4. Efectos del porcentaje lipídico de la dieta en el crecimiento de <i>Seriola lalandi</i>	31
3.4.1. Incremento de la tasa metabólica postprandial (ITMP).....	32
3.5. Microbiota bacteriana intestinal.....	32
3.5.1. Resultados de pirosecuenciación del gen 16S rRNA	32
3.5.2. Microbiota asociado con heces de <i>Seriola lalandi</i>	35
3.5.3. Efecto de la temperatura sobre la microbiota fecal de <i>Seriola lalandi</i>	37
3.5.4. Efectos de la porción de lípidos en la dieta sobre la microbiota fecal de <i>Seriola lalandi</i>	38
Capítulo 4. Discusión	43
Capítulo 5. Conclusiones	50
Literatura citada	52

Lista de figuras

Figura		Página
1	Gradiente térmico.....	12
2	Cámara de respirometría de acrílico.....	15
3	Diseño experimental.....	19
4	Preferencia térmica de <i>Seriola lalandi</i> durante un ciclo diurno.....	25
5	Comportamiento termorregulador de <i>S. lalandi</i> bajo diferentes temperaturas de aclimatación.....	26
6	Temperaturas Críticas de <i>Seriola lalandi</i> representadas en un polígono térmico.....	27
7	Consumo de oxígeno de rutina.....	28
8	Consumo de oxígeno de <i>Seriola lalandi</i> después de haber sido estimulados con persecución (Chas).....	29
9	Consumo de oxígeno de <i>Seriola lalandi</i> después de haber sido estimulados con TIMRmax o TIMRmin.....	30
10	Incremento de la Tasa Metabólica Postprandial (ITMP).....	32
11	Curvas de rarefacción que muestran el número de OTUs en heces de <i>S. lalandi</i>	33
12	Índices de Chao y Shannon-Wiener sobre la microbiota asociada a heces de <i>S. lalandi</i>	34
13	Abundancia relativa (%) de los principales géneros bacterianos observados.....	36
14	Análisis de componentes principales (PCA).....	37
15	Comparación de los perfiles microbianos en la condición control y experimental.....	38
16	Comparación de los perfiles microbianos entre las distintas dietas en 20 °C.....	39
17	Comparación de los perfiles microbianos entre las distintas dietas en 26 °C.....	41

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Formulación de dietas experimentales y composición proximal.....	18
2	Tasa de respuesta a la aclimatación (ARR).....	28
3	Coefficiente de temperatura (Q_{10}).....	29
4	Peso de <i>Seriola lalandi</i> bajo diferentes temperaturas de aclimatación.....	31
5	Peso de los juveniles de <i>Seriola lalandi</i> bajo los tratamientos de nutrición y aclimatación térmica.....	31

Capítulo 1. Introducción

Seriola lalandi es un pez de la familia Carangidae que se distribuye en aguas tropicales y sub-tropicales del océano Pacífico e Índico en países como Sudáfrica, Japón, el sureste de Australia y a lo largo del continente americano desde Chile hasta México (Hutson et al., 2007; Abbink et al., 2012). Este pez se encuentra en zonas costeras y pelágicas a profundidades de 20 a 70 m donde alcanza una talla de 145 a 190 cm de longitud total y de 45 a 80 kg de peso (Avilés y Castelló, 2004; Abbink et al., 2012). Además, es un pez carnívoro con altos requerimientos energéticos el cual se alimenta de pequeños peces como macarela, anchoveta, sardina y de moluscos como el calamar (Avilés y Castelló, 2004; Booth et al., 2010; Bowyer et al., 2012).

Algunos factores que han contribuido para que *S. lalandi* sea considerada una especie de importancia para la acuicultura son: 1) se ha logrado cerrar el ciclo de vida en cautiverio, 2) tiene una alta tasa de crecimiento que le permite alcanzar la talla comercial en aproximadamente 1 año y 3) debido a las características de su carne, presenta buena comerciabilidad (Abbink et al., 2012). Este pez conocido como Yellowtail kingfish ha sido criado en cautiverio durante más de 50 años en países como Japón (Nakada, 2000), aunque actualmente se cultiva en Australia, Estados Unidos de Norteamérica y México entre otros.

El cultivo de *S. lalandi* se lleva a cabo en jaulas flotantes en el mar, donde los juveniles son expuestos a la variabilidad de las condiciones ambientales, por ejemplo las fluctuaciones diarias y anuales de las temperaturas superficiales del agua. Las temperaturas del agua en la zona de cultivo del jurel aleta amarilla *S. lalandi* en las costas del Pacífico Mexicano son de 15 a 28 °C dependiendo de la estación del año. Así mismo, en las zonas de cultivo en México (Bahía Magdalena) los juveniles experimentan fluctuaciones diurnas de temperatura superficial del agua que van desde 15 a 18 °C y de 23 a 28 °C dependiendo de la estación del año (Avilés y Castelló, 2004).

Es conocido que la temperatura ambiental es un factor que influye en el desempeño fisiológico y metabólico de los organismos ectotermos como los peces (Dowd et al., 2006; Pirozzi and Booth, 2009; Clark et al., 2013; Schulte, 2015; Enders and Boisclair, 2016); de esta manera, se reconoce que el mecanismo de termorregulación a través del desplazamiento es una respuesta fisiológica que presentan los peces para mantener su homeostasis (Fry, 1947). Por otro lado, el efecto directo de la temperatura ambiental en la tasa de consumo de oxígeno de peces, es un reflejo del efecto de la temperatura ambiental en el metabolismo de éstos organismos (Jobling, 1981). Es posible señalar que las fluctuaciones en la

temperatura diaria o estacional influyen en el costo metabólico para mantener diversos procesos fisiológicos tales como el crecimiento y la alimentación (Secor, 2009; Miegel et al., 2010; Tirsgaard et al., 2015). Además de ello, se ha demostrado que la temperatura ambiental tiene un efecto significativo en la eficiencia alimenticia de los peces, siendo que en temperaturas óptimas los organismos son capaces de aprovechar de manera más eficiente los elementos de la dieta, resultando en un mayor porcentaje de crecimiento; por otro lado, en temperaturas sub-óptimas, los organismos pueden disminuir esta eficiencia alimenticia o inclusive dejan de alimentarse (Avilés y Castelló, 2004).

Un factor fundamental en los procesos de asimilación y absorción de nutrientes de la dieta en diferentes organismos marinos, es la microbiota asociada al sistema digestivo. De esta manera, la microbiota intestinal desempeña una función clave en el mantenimiento del estado de salud óptimo de peces (Nayak, 2010; Pérez et al., 2010). Su función en la adquisición de nutrientes a partir de la dieta ha sido reportada en diferentes peces tanto de agua dulce como de agua salada (Ray et al., 2012; Wang et al., 2017). Uno de los elementos de la dieta para peces de mayor interés son los lípidos ya que son muy importantes para mantener el equilibrio energético en peces carnívoros como *S. lalandi*, y la microbiota intestinal participa en la solubilización de éstos, en la estimulación de la absorción de ácidos grasos y en la formación de gotas lipídicas en el epitelio intestinal y hepático (Semova et al., 2012). Debido a las diferentes funciones atribuidas a la microbiota intestinal de los peces y al efecto determinante de la temperatura sobre la fisiología y el metabolismo de los organismos ectotermos, el efecto de la temperatura ambiental sobre la microbiota intestinal, también podría regular el equilibrio energético de *S. lalandi*, su bienestar y desarrollo.

Debido a lo referido anteriormente, las fluctuaciones térmicas podrían afectar la microbiota intestinal y el estado de salud de *S. lalandi*, dependiendo del tiempo de exposición, sin embargo, hasta donde sabemos no hay estudios disponibles sobre los efectos de la temperatura ambiental en la composición taxonómica de la microbiota intestinal de *S. lalandi*. En este caso, la temperatura podría afectar la microbiota intestinal de organismos ectotermos de dos maneras diferentes: (1) al modular las respuestas metabólicas del huésped debido a variaciones térmicas o (2) tener un efecto directo en la comunidad residente de la microbiota.

En la actualidad la temperatura superficial del mar se ha visto afectada por una serie de eventos naturales que se han intensificado en los últimos 10 años. La temperatura en las costas del océano pacífico Mexicano ha sido afectada principalmente por el fenómeno de “El Niño”, este patrón climático es un desplazamiento de las corrientes frías del norte por corrientes de agua cálida del sur (Stenseth et al., 2002). Si bien este

movimiento de corrientes de agua marina son naturales y se presentaban con una estacionalidad, lapsos e intensidad relativamente definidos, en los últimos años se han notado con mayor intensidad y en lapsos cada vez más prolongados (Morice et al., 2012).

Debido a que la temperatura ambiental tiene un efecto en la fisiología de los organismos marinos con relación a su historial térmico reciente, el estadio de vida, o el estado de salud (Jobling, 1981; Clarck and Johston, 1999), es importante estudiar los efectos de la temperatura ambiental sobre los organismos ectotermos como los juveniles de la especie *S. lalandi* criados en cautiverio bajo condiciones controladas y explorar el efecto de las temperaturas que se presentan en las zonas de cultivo de ésta especie en Baja California, México. Por esta razón, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar el efecto de diferentes temperaturas de aclimatación en juveniles de la especie *S. lalandi*, además de identificar la importancia de los lípidos dietarios para mantener sus requerimientos energéticos y generar reservas energéticas, además de identificar si existe un afecto en la comunidad microbiana intestinal que influya en el mantenimiento de un estado saludable y crecimiento, bajo temperaturas óptimas y sub-óptimas.

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Seriola lalandi*

S. lalandi es un organismo de gran importancia para la acuicultura en países como México, Australia y Japón. En Australia, de 20 a 25 °C se considera un rango térmico adecuado para mantener su alta tasa metabólica de rutina y crecimiento, lo cual se correlaciona con los altos requerimientos de oxígeno disuelto en el agua para mantener sus procesos metabólicos y fisiológicos (Pirozzi and Booth, 2009). Así mismo se ha demostrado que los requerimientos de proteína dietética son altos en comparación con otros carnívoros, debido a que *S. lalandi* aparentemente utiliza una proporción considerable de la proteínas que consume como fuente energética (Booth et al., 2010). Así mismo, se ha demostrado que una temperatura de 26.5 °C en el cultivo de *S. lalandi* tiene un efecto benéfico en el crecimiento, la ingesta de alimento y la eficiencia de conversión alimenticia; siendo que las temperaturas extremas inhiben el crecimiento (<18 °C y >28 °C) y la tasa de conversión alimenticia (Abbink et al., 2012).

1.1.2. Biología térmica de peces

Los peces son organismos incapaces de mantener fisiológicamente una temperatura corporal distinta a la temperatura del medio ambiente que los rodea, para ello exhiben un mecanismo de regulación corporal denominado ectotermia a partir de un comportamiento termorregulador (Castrelin and Reynolds, 1980); al desplazarse en el agua, los peces seleccionan o elijen aquellos intervalos térmicos donde la temperatura no representa un factor que limite los procesos metabólicos tales como la contracción muscular, la digestibilidad del alimento o la osmorregulación.

El comportamiento termorregulador que desempeñan los peces para mantener la temperatura corporal es un mecanismo codificado genéticamente, sin embargo, puede llegar a ser modificado o alterado por factores no térmicos tales como la disponibilidad de alimento, depredación, contaminación, estadio de vida, la reproducción o la migración (Lee, 2003; Lessard and Hayes, 2003; Díaz et al., 2007; Radonic et al., 2007; Valdebenito et al., 2009). Existen diferentes trabajos donde se indica que a través del comportamiento termorregulador es posible determinar la temperatura preferida final de los peces la cual está relacionada con la temperatura óptima para su crecimiento y por ello, para el desarrollo óptimo de diferentes procesos fisiológicos y metabólicos como la asimilación de nutrientes de la dieta (Miegel et al., 2010; Abbink et al., 2012; Bowyer et al., 2012; Bowyer et al., 2013). Esto nos indica que evolutivamente estos organismos han desarrollado este comportamiento termorregulador como el principal mecanismo para la regulación de sus procesos fisiológicos y metabólicos lo que los hace susceptibles cuando son expuestos a temperaturas anormales o extremas por lapsos de tiempo prolongados.

Cuando los organismos marinos como los peces se encuentran en un medio ambiente con temperaturas extremas como ocurre en arrecifes, manglares o cuerpos de agua poco profundos, se ha observado que presentan mayor tolerancia térmica que aquellos organismos que viven en ambientes térmicamente estables (Mora and Ospína, 2001; Emme and Bennett, 2009; Madeira et al., 2012). Esto se podría atribuir a diferentes respuestas metabólicas y fisiológicas que han desarrollado a causa de su permanencia en dichas condiciones ambientales.

Aunque se cuenta con un número extenso de publicaciones que hacen referencia al efecto de la temperatura en diversos procesos fisiológicos de peces, tales como el consumo de oxígeno y la termotolerancia (Pörtner et al., 2001; Mora and Maya, 2006; Díaz et al., 2007; Majhi et al., 2013), el efecto de la temperatura en la tasa metabólica de rutina (Wesley et al., 2006), o en la nutrición y crecimiento bajo diferentes temperaturas (Bowyer et al., 2012; Bowyer et al., 2013), aún es necesario estudiar el efecto de

la temperatura en diferentes especies con altos requerimientos energéticos tales como *S. lalandi* el cual es un organismo muy activo y los cambios en la temperatura pueden afectar de manera significativa su rendimiento fisiológico.

1.1.3. Tasa metabólica

La tasa de consumo de oxígeno es una de las respuestas fisiológicas que puede ser correlacionada con cambios en el medio ambiente (Jhonston and Dunn, 1987). El análisis de la tasa de consumo de oxígeno de especies marinas ha sido empleado para dilucidar el efecto de diferentes factores abióticos tales como la temperatura o la salinidad debido a que está íntimamente relacionada con las respuestas metabólicas a nivel energético (Re et al., 2004; Wesley et al., 2006; Díaz et al., 2007). El cambio en la tasa de consumo de oxígeno se interpreta como el trabajo metabólico y el flujo energético para recuperar un estado de equilibrio u homeostasis.

Se han definido y caracterizado tres estados metabólicos para comprender las variaciones en la tasa de consumo de oxígeno: el primero de ellos es el “metabolismo estándar” (SMR - Standar Metabolic Rate), el cual, puede ser clasificado como el metabolismo de manutención donde el principal factor es el mantenimiento de la tasa energética requerida para mantener al organismo con vida. El segundo es el “metabolismo de rutina” (RMR - Rutin Metabolic Rate), el cual se refiere al metabolismo energético destinado a movimientos espontáneos. Finalmente el “metabolismo activo” (MMR - Maximum Metabolic Rate), el cual se define como la demanda energética para llevar a cabo cualquier proceso de locomoción extenuante, en donde existe una demanda mayor de oxígeno por la contracción muscular (Brett and Groves, 1979).

Para determinar la temperatura ambiental donde se presenta el mayor desempeño aerobio (metabolismo respiratorio), se ha establecido la determinación del campo metabólico a través de la diferencia de la MMR y SMR (Clark et al., 2013). Este concepto nos indica que aquella condición que favorezca el metabolismo aerobio como indicador de la síntesis de ATP, será el que presente mayor alcance aeróbico y por lo tanto un estado fisiológico y metabólico favorable (Schulte, 2015). En este sentido, la determinación del campo metabólico es una forma de cuantificar y dilucidar el efecto de variables como la temperatura y la dieta, en la energía que se dispone para hacerle frente a dichas condiciones.

Por otro lado, a través de la medición de la tasa de consumo de oxígeno se puede vislumbrar el costo energético que generan los procesos de digestión a través de la medición de la tasa de consumo de oxígeno postprandial o incremento aparente de calor (ICA) (Medland and Beamish, 1985; Rosas et al., 2007). De esta forma, es posible identificar las modificaciones en la tasa metabólica, acompañadas por cambios cardiovasculares por la alimentación y realizar una evaluación de los requerimientos energéticos para la digestión tales como la movilización del alimento, secreción de enzimas, transporte de nutrientes entre otros.

1.1.4. Nutrición de organismos marinos

Actualmente para la nutrición de especies marinas, se han estudiado diversas alternativas que reduzcan los niveles de proteína y aceite de pescado en las dietas formuladas. Algunas estrategias son la sustitución de elementos de origen animal con productos derivados de la soja o sub-productos de aves de corral (Silva-Carrillo et al., 2012; Bowyer et al., 2013; Hernández et al., 2014). De igual forma se han determinado los niveles mínimos de proteínas y lípidos en la dieta para diferentes peces con el objetivo de mantener el crecimiento, reducir costos de producción del alimento y disminuir la cantidad de nitrógeno excretado en los sistemas de cultivo (Abdo de la Parra et al., 2010). La constante en estos trabajos es que se ha demostrado que muchos organismos marinos tienen una bio-síntesis deficiente de ácidos grasos altamente poli-insaturados que los hace dependientes de dichos nutrientes para no afectar sus niveles energéticos y finalmente su crecimiento. Además, muchos peces tanto de agua dulce como de agua marina son carnívoros, por ello utilizan los aminoácidos y lípidos para mantener el metabolismo energético y el crecimiento somático, por lo cual se sugiere la sustitución parcial de los elementos de origen animal por fuentes alternativas de origen vegetal dependiendo de factores como la actividad y la biología de cada especie.

En organismos carnívoros, las proteínas provenientes de la dieta juegan dos funciones de suma importancia: 1) Sirven para la formación de estructura muscular durante el crecimiento (aumento de biomasa) y 2) Pueden ser utilizadas como sustrato para mantener el metabolismo energético. Por otro lado, los lípidos de la dieta son moléculas muy importantes para el balance energético y generar el máximo crecimiento ya que estos, son el principal sustrato energético para los peces carnívoros. Debido a estos requerimientos nutricionales, la dieta para organismos carnívoros marinos debe de contener proporciones

adecuadas de ácidos grasos para sostener el metabolismo basal y el metabolismo de rutina permitiendo el máximo aprovechamiento de proteína de la dieta para el crecimiento (Abdo de la Parra et al., 2010).

Cuando los factores ambientales como las variaciones en la temperatura mantienen al organismo en un constante desgaste energético, las proteínas también pueden representar una fuente energética importante sobre todo cuando se presenta una deficiencia de lípidos en la dieta (Miegel et al., 2010; Abbink et al., 2012; Bowyer et al., 2012; Bowyer et al., 2013). Es por ello que es de suma importancia determinar y relacionar la biología térmica de las diferentes especies y correlacionar esta información con los aspectos de interés tal como su nutrición, reproducción o el crecimiento.

1.1.5. Importancia de la microbiota intestinal en Peces

La temperatura tiene un efecto determinante en factores como la calidad del agua, en la productividad primaria (afloramiento de microalgas), descomposición de la materia orgánica, así como en la abundancia, riqueza y distribución de microorganismos tanto en los sistemas de cultivo como en el medio ambiente natural. Estos factores podrían afectar de manera colateral la homeostasis o el balance energético de los peces, y dependiendo de su intensidad y frecuencia, podrían estar ocasionando enfermedades y la muerte de éstos.

La importancia de las comunidades microbianas asociadas a los organismos marinos aún no está claramente definida. De hecho son muchas las maneras en cómo los microorganismos, como las bacterias, pueden afectar a los organismos marinos. Una de ellas y tal vez la que más preocupa al hombre, es la presencia de patógenos que podrían provocar infecciones bajo un estado desfavorable de los peces (Toranzo et al., 2005; Vázquez et al., 2005). Existe evidencia de que los peces bajo estrés térmico son susceptibles a ser infectados por bacterias patógenas oportunistas, ocasionando su muerte tanto en sistemas de cultivo como en estado libre (Thune et al., 1993).

Por otra parte, se ha estudiado que muchos de estos microorganismos son importantes para mantener un estado saludable en las especies marinas. Existen diferentes comunidades microbianas asociadas a distintos tejidos de los hospederos, entre éstas destaca la comunidad microbiana asociada al intestino. Se ha señalado que estos microorganismos podrían tener un papel muy importante en diferentes aspectos tales como la generación y mantenimiento de un sistema inmunitario saludable, así como la constante

protección contra organismos patógenos (Gómez and Balcázar, 2008) y recientemente se han investigado por su papel en la digestión y aprovechamiento de nutrientes de la dieta. Como ya se mencionó anteriormente, los lípidos son de suma importancia para mantener el metabolismo energético y recientemente se ha estudiado el papel que juegan las comunidades bacterianas en la lipólisis luminal; es decir, la influencia de las bacterias durante la emulsificación y absorción de lípidos, así como la solubilización de vitaminas (Semova et al., 2012).

Se ha demostrado que la microbiota intestinal y el hospedero presentan una coevolución haciendo énfasis en las relaciones simbióticas (Irianto and Austin, 2002; Burr et al., 2007; Ringo et al., 2010; Reyes-Becerril et al., 2011; Zhang et al., 2014). Igualmente se ha estudiado la influencia de la dieta en la composición de la microbiota intestinal del hospedero, la interacción a nivel trófico, la salinidad, el pH, estacionalidad y las interacciones ecológicas (Roeselers et al., 2011). Dentro de los microorganismos que han sido estudiados por sus efectos benéficos en sus hospederos se encuentra *Lactobacillus rhamnosus* (Irianto and Austin, 2002), *Bacillus subtilis* (Taoka et al., 2006), *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus plantarum* (Balcázar et al., 2006; Vendrell et al., 2007) cuya función es la inmunoestimulación y mejorar la sobrevivencia de los hospederos, posterior a presentar infecciones con patógenos. De igual forma, se ha demostrado que existen bacterias que determinan la sobrevivencia de peces en estadios larvarios y que ayudan al establecimiento de la microbiota bacteriana en adultos, uno de estos microorganismos es *V. alginolyticus*, siendo ésta bacteria efectiva en la reducción de enfermedades ocasionadas por *Aeromonas* (Austin, 1995). Por otro lado, algunos géneros que resultan patogénicos o dañinos para los peces y que provocan alta mortalidad son las *Pseudomonas*, *Cytophaga* y *Flexibacter* (Gómez-Gill et al., 2000; Ringo et al., 1995).

1.1.6. Metagenómica

Actualmente se utilizan herramientas genómico-moleculares para la detección y caracterización de las comunidades microbianas (Navarrete et al., 2009; Lin et al., 2010; Aguilera et al., 2013) debido al aumento significativo del número de organismos detectados en comparación a técnicas convencionales. Los métodos moleculares para la detección de microorganismos se basan en secuencias específicas de DNA, como por ejemplo la amplificación de gen 16S rADN (Denev et al., 2009) y por ello, no se requiere de medios de cultivo que limiten la identificación de los organismos considerados como no cultivables. Con la aparición de la secuenciación de nueva generación, surge una nueva rama de la microbiología llamada metagenómica. Whiteley et al., (2012) describe dos tipos de acercamientos: La metagenómica dirigida al

gen 16S (target sequence), la cual consiste en la extracción del ADN bacteriano total de una muestra determinada, la posterior amplificación del gen 16S rADN y la secuenciación del mismo permitiendo crear un perfil filogenético de la estructura bacteriana. La segunda aproximación es la metagenómica de genomas completos (Whole genome), donde se puede conocer, además del genoma completo, el ecosistema microbiano asociado y la función bioquímica que se lleva cabo en el micro-ecosistema secuenciado. Gracias a estas investigaciones, se ha estimado que solo el 0.1% de los microorganismos pueden cultivarse (Hill et al., 2000), mientras que más del 90% de los que se observan pueden ser identificados y analizados molecularmente (Escalante, 2007) lo que genera mayor profundidad de análisis e integración con la fisiología del hospedero.

1.2. Justificación

Debido al efecto determinante de la temperatura ambiental en la fisiología y metabolismo de los peces, la variación anormal de la temperatura ambiental podría tener un efecto en la homeostasis energética afectando procesos como la nutrición, y en consecuencia su tasa de crecimiento y desarrollo. Por ello, es importante la caracterización de las respuestas fisiológicas y metabólicas de especies marinas como *S. lalandi* ante diferentes escenarios térmicos con el fin de aportar conocimiento que pueda contribuir en campos de estudio como la ecología de comunidades, fisiología integrativa y acuicultura de especies marinas.

1.3. Hipótesis

El rango de temperaturas que se han definido como óptimas para el cultivo de *Seriola lalandi* tendrán un efecto positivo en el desempeño fisiológico y metabólico así como en la nutrición y en la estructura de la microbiota intestinal lo que manifestará un estado saludable de los juveniles.

La alimentación de los juveniles de la especie *S. lalandi* con piensos correctamente balanceados tendrán un efecto positivo en la generación de reservas energéticas y con ello será posible mantener o recuperar una homeostasis energética cuando experimenten temperaturas anormales.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto de diferentes temperaturas de aclimatación en la fisiología térmica, metabolismo respiratorio, nutrición y en la estructura de la microbiota intestinal de juveniles de *Seriola lalandi*.

1.4.2. Objetivos Particulares

1. Determinar el efecto de diferentes temperaturas de aclimatación en el comportamiento termorregulador por medio del método gravitacional y la tolerancia térmica con el método dinámico de los juveniles de la especie *Seriola lalandi*.
2. Evaluar el efecto de las temperaturas de aclimatación en la tasa de consumo de oxígeno de rutina de juveniles de la especie *Seriola lalandi*.
3. Evaluar el campo aeróbico metabólico y el campo aeróbico térmico a diferentes temperaturas de aclimatación utilizando los métodos de persecución (Chase) y TIMR (Temperature Induced Metabolic Rate) en juveniles de *Seriola lalandi*.
4. Evaluar la relación entre la temperatura de aclimatación y la proporción de lípidos en la dieta (7, 14 y 21%) a través de la tasa metabólica postprandial de *Seriola lalandi*.
5. Evaluar el crecimiento de los juveniles de la especie *Seriola lalandi* ante el efecto de la temperatura de aclimatación y la proporción de lípidos dietarios (7, 14 y 21%).
6. Analizar el efecto de la temperatura de aclimatación y la proporción de lípidos dietarios en la composición de la microbiota intestinal de los juveniles de la especie *Seriola lalandi*.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Obtención de organismos

Los organismos de la especie *Seriola lalandi* se obtuvieron como donativo de la empresa BajaSeas Aquaculture que se encuentra ubicada en el ejido Eréndira en el estado de Ensenada Baja California México a 99 km de las instalaciones del CICESE. El traslado de 400 organismos de un peso promedio de 7 ± 2 g se realizó en transporte terrestre dentro de un estanque de 500 L. Durante el traslado, se realizaron mediciones de los niveles de oxígeno disuelto en el agua para mantener como mínimo 5 mg/L a través de suministro de oxígeno líquido.

Una vez en las instalaciones del CICESE, los peces se distribuyeron en dos estanques de 1000 L ubicados dentro de un invernadero de plástico de 15 m³, cada estanque se encontraba conectado a un sistema de recirculación de agua de mar, oxigenación constante con piedras de aireación y un sistema de control de temperatura el cual consta de un controlador digital (Finnex, HC-0810M, Chicago, IL, US) y una resistencia de 1000 Watts (Finnex, TH-800 POLUS, Chicago, IL, US). Los organismos se alimentaron con alimento seco de la marca Skretting (2 mm) hasta los ensayos de nutrición.

El agua dentro del sistema de recirculación, fue filtrada a través de un tratamiento de sedimentación de materia orgánica, filtración biológica y tratamiento con luz ultravioleta. Una vez que se filtró el agua de mar, ésta fue distribuida a los diferentes laboratorios de biotecnología marina. La temperatura se mantuvo en un rango de 24 ± 1 °C dependiendo de la hora del día, donde se presentaron temperaturas desde 25 °C durante el día hasta 23 °C durante la noche. Los organismos se mantuvieron en estas condiciones por una semana antes de comenzar con los experimentos de preferencia térmica.

2.2. Biología térmica

2.2.1. Preferencia térmica a través del método gravitacional y el método aguda

Para determinar la temperatura preferida individual, se marcaron 20 peces con diferentes lentejuelas las cuales se colocaron en la parte superior frontal donde inicia la aleta dorsal con ayuda de una aguja e hilo

quirúrgicos. Para ello, los peces fueron anestesiados al sumergirlos de 5 a 8 s en una solución de agua de mar y 2-fenoxi-etanol 1000:6 (Sigma). Una vez que se les colocó la maraca, los peces se regresaron al estanque de donde provenían para su recuperación de la anestesia.

Después de 24 horas de colocar las lentejuelas, se seleccionaron 5 peces y se colocaron dentro de un gradiente de temperaturas (Figura 1) para determinar su preferencia térmica individual a través del método gravitacional. El método gravitacional consiste en registrar la ubicación de los organismos cada hora en un periodo de 24 horas continuas simulando la intensidad y tipo de luz que ocurre en un ciclo diurno. El procedimiento se repitió por triplicado con 5 organismos diferentes cada vez ($n = 20$).

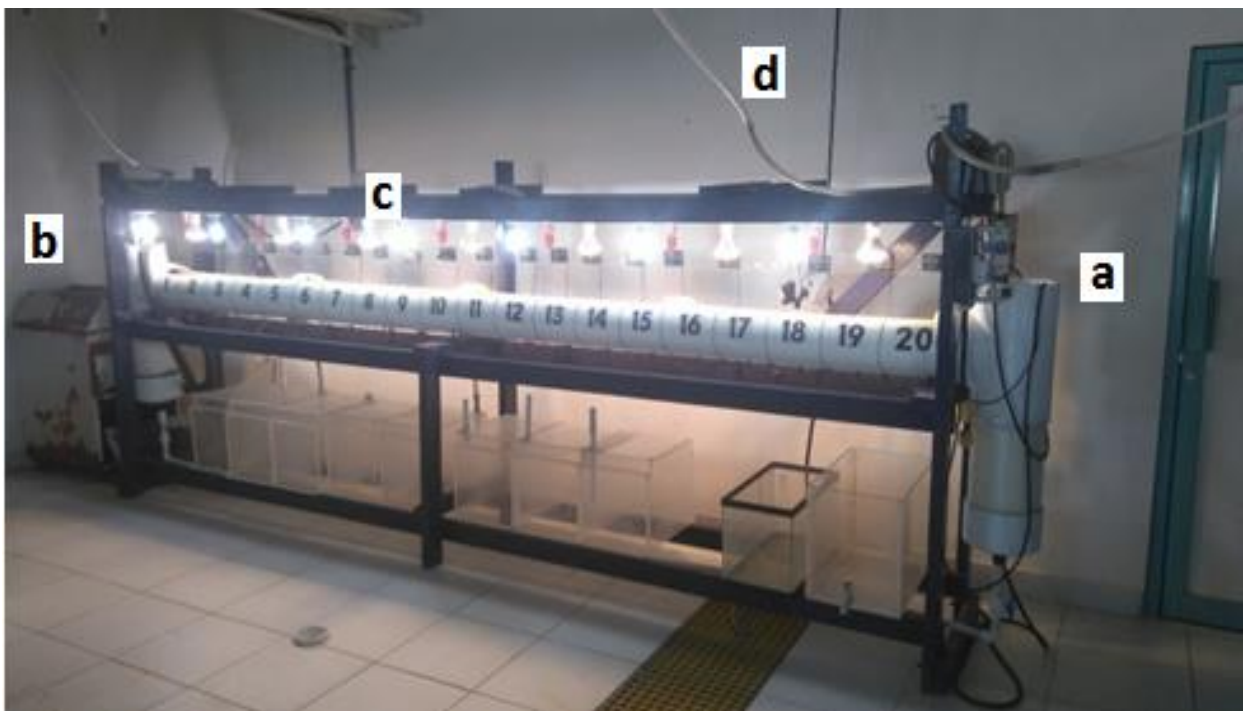


Figura 1. Gradiente térmico. a.- Controlador de temperatura y resistencia 1000 W, b.- Sistema de enfriamiento, c.- Sistema de luces (luz blanca, amarilla y roja), d.- Entrada de agua y oxígeno.

Para determinar la preferencia térmica aguda, se utilizaron 250 organismos los cuales se distribuyeron en 5 estanques de 500 L (50 por estanque) conectados al sistema de recirculación de agua marina, con suministro de oxigenación constante y los sistemas de temperatura antes mencionados. La temperatura de cada estanque se incrementó o disminuyó 1 °C por día hasta conseguir las temperaturas de 20, 23, 26, 29 y 32 °C. Dichos organismos se aclimataron a estas temperaturas por 21 días. Una vez que transcurrieron los 21 días de aclimatación, se marcaron con lentejuelas 10 organismos al azar por cada tratamiento.

Después de 24 horas de colocar las lentejuelas, de uno de los tratamientos de aclimatación se seleccionaron 5 organismos previamente marcados y se colocaron en el gradiente de temperatura antes referido. El método agudo consiste en registrar la ubicación individual cada 10 min en un periodo de 2 horas, una vez que se registraron los datos del primer grupo se realizó el mismo procedimiento con un grupo nuevo (n = 10). El método se aplicó a cada grupo de aclimatación para conocer la preferencia térmica aguda bajo las cinco temperaturas.

Las temperaturas seleccionadas por los organismo durante el método gravitacional y el método agudo fueron graficadas en cajas en paralelo y los intervalos de confianza de las medianas fueron calculados mediante la siguiente formula.

$$I. C. = \frac{M \pm 1.58 \Delta H}{\sqrt{N}} \quad (1)$$

Dónde: I.C. son los intervalos de confianza, M es la mediana, 1.58 es la constante, ΔH es la amplitud de la caja (cuartil 75%-cuartil 25%) y N es el número de organismos.

2.2.2 Temperaturas críticas

Se determinó la temperatura crítica máxima (TCMax) al exponer a los peces a un incremento térmico de 1 °C por minuto hasta observar la pérdida de la verticalidad de cada uno de estos. Para el experimento de TCMax se utilizaron 5 organismos sin tratamiento previo más que la aclimatación térmica los cuales se colocaron en una pecera de 60 L con 15 L de agua de mar con valores de oxígeno disuelto cercanos a la saturación.

El incremento térmico del agua se indujo con una resistencia de 1,000 W dentro de la pecera. Durante el incremento de la temperatura del agua se observó el comportamiento de los peces hasta identificar los estados de agitación, resiliencia momentánea y finalmente la pérdida de la verticalidad. Cuando se registró la temperatura en que los peces perdieron la habilidad de desplazamiento, se extrajo al pez de la pecera y se coloca en su estanque de aclimatación para su recuperación. Este procedimiento se repitió con cinco organismos sin tratamiento previo más que la aclimatación térmica (n = 10). Es de suma importancia identificar los estados de conducta antes de la pérdida de verticalidad y no llegar a la muerte del pez.

Para el caso de la temperatura crítica mínima (TCMin), se expusieron 5 peces de cada temperatura de aclimatación a un decremento de su temperatura corporal a una tasa de 1 °C por minuto. Para ello se utilizó el gradiente térmico antes referido con un gradiente de temperaturas que fue desde la temperatura de aclimatación correspondiente hasta 9 ± 1 °C. Los organismos seleccionados se colocaron individualmente en canastillas de plástico y se expusieron al gradiente, donde se disminuyó su temperatura corporal a la tasa antes referida. Este procedimiento se repitió con cinco organismos sin tratamiento previo más que la aclimatación térmica ($n = 10$). Se determinó el punto de pérdida de la verticalidad y se extrajeron los peces del gradiente de temperaturas para ser colocados en el estanque de aclimatación.

Con los valores de TCMax y TCMin se determinó la tasa de respuesta a la aclimatación (ARR) mediante la siguiente ecuación de Claussen (1977).

$$ARR = \frac{\Delta TCMax}{AT} = \frac{TCMax2 - TCMax1}{TA2 - TA1} \quad (2)$$

Donde TCMax2-TCMax1 representan la diferencia entre los valores de las medianas de las temperaturas en la cual los organismos alcanzaron la desorientación total bajo cada temperatura de aclimatación, y TA2 y TA1 es la diferencia en °C de las temperaturas de aclimatación en las cuales se están midiendo las respuestas.

2.3 Respuestas metabólicas

2.3.1 Tasa de respiración

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la tasa de consumo de oxígeno, se realizaron las mediciones de consumo de oxígeno de los juveniles aclimatados a cada temperatura de aclimatación. Para ello, se tomaron al azar cinco organismos por cada tratamiento los cuales fueron introducidos individualmente en cámaras de respirometría de 1,500 ml (Figura 2). Las cámaras respirometría permanecieron en un estanque con agua a la temperatura de aclimatación durante las mediciones de consumo de oxígeno. Los peces evaluados fueron privados de alimento 48 horas previas a la medición del consumo de oxígeno con la finalidad de evitar los efectos que pudieran tener la alimentación en la tasa metabólica.

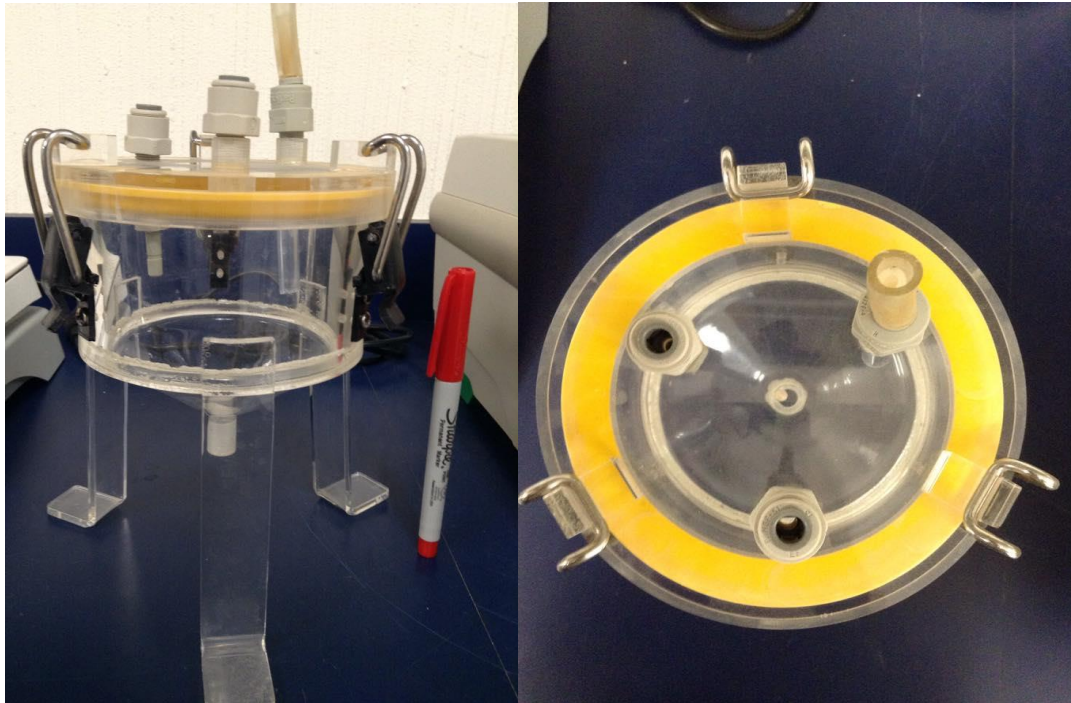


Figura 2. Cámara de respirometría de acrílico. El volumen de las cámaras fue de 1.5 L

Una vez que los organismos fueron colocados en el sistema de respirometría, se comenzaron a registrar los valores de oxígeno disuelto en las cámaras cada 30 s. Los registros de oxígeno disuelto se clasificaron en estabilización, inicial y final. Los registros de estabilización sirvieron para determinar un estado de No-agitación provocado por el sistema de respirometría o la manipulación del organismo. Los registros de oxígeno disuelto iniciales se registraron al cerrar la entrada de agua a la cámara y se consideraron como el valor inicial de oxígeno disuelto, finalmente los registros de oxígeno disuelto finales se registraron después de 5 min de incubación sin recambio de agua, lo que ocasionó una disminución del 20 al 25% del oxígeno disuelto en la cámara debido a la respiración del pez, estos niveles de oxígeno disuelto finales no representaron un estrés adicional al no disminuir de dichos porcentajes. Este procedimiento se realizó tres veces más con los mismos organismos por cada tratamiento ($n = 15$).

El consumo de oxígeno se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de oxígeno disuelto registrado en la entrada (oxígeno inicial) y a la salida (oxígeno final) de cada cámara, y fueron expresados como $\text{mg O}_2\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$ mediante la siguiente fórmula.

$$TCO = \frac{C_T - C_0}{W * T} \quad (3)$$

Donde TCO es la tasa de consumo de oxígeno, C_t es el contenido de oxígeno en la cámara con el sistema abierto (entrada de agua), C_0 es el contenido de oxígeno después del periodo de 5 minutos sin entrada de agua, W es el peso húmedo de cada pez (por su sigla en inglés Weight), y T es el tiempo de medición (Zheng et al., 2008).

Con los valores de consumo de oxígeno se calcularon los cocientes de temperatura Q_{10} para evaluar el efecto de la temperatura de aclimatación sobre la tasa de consumo de oxígeno usando la ecuación de Schmidt-Nielson 1997:

$$Q_{10} = \left(\frac{TCO_2}{TCO_1} \right)^{\frac{10}{T_{em2} - T_{em1}}} \quad (4)$$

2.3.2. Campo de actividad metabólica

El campo de actividad metabólica (CAM) se determinó a través del método “Temperatura inductora de actividad metabólica (TIMR por sus siglas en inglés) de acuerdo a la metodología de Paschke et al., 2018. Para ello se utilizaron 10 organismos diferentes de cada tratamiento de aclimatación. Cinco de estos se utilizaron para determinar la tasa metabólica baja (LMR) y el resto para determinar la tasa metabólica alta (HMR).

La LMR se determinó al disminuir la temperatura corporal a una tasa de 1°C por minuto hasta el 110% del valor de TCM_{in}, la disminución se llevó a cabo en un gradiente térmico donde en un extremo se mantuvo la temperatura de aclimatación correspondiente y por el otro de disminuyó hasta el valor del 110% de la TCM_{in} a esta temperatura se le denominó TIMR_{min} por sus siglas en inglés Temperature Induces Minimum Respiratory Activity. Una vez que los organismos permanecieron un minuto en la TIMR_{min}, cada uno de ellos se colocó en una cámara de respirometría y se realizaron las mediciones de consumo de oxígeno durante 5 min por triplicado bajo dicha temperatura (n = 15 datos).

Para el caso de la tasa respiratoria máxima, los organismos se expusieron a un incremento térmico del 90% del valor de TCM_{max}, a dicha temperatura se le denominó TIMR_{max} (Temperature Induces Maximum

Respiratory Activity). Para ello se introdujeron cinco organismos pertenecientes a una de las temperaturas de aclimatación a una pecera de 60 L con 15 L de agua de mar. Se incrementó la temperatura 1 °C por minuto hasta llegar a la TIRAm_{ax}. Una vez que los organismos permanecieron un minuto en la TIRAm_{ax}, cada uno de ellos se colocó en una cámara de respirometría y se realizaron las mediciones de consumo de oxígeno durante 5 min por triplicado bajo dicha temperatura (n = 15 datos). El máximo alcance aeróbico se determinó a través del cálculo de la diferencia entre LMR y HMR.

2.3.3. Alcance aeróbico “Chase”

Para calcular el CAM a través del método de Chase fue necesario obtener la máxima tasa metabólica (MMR) y calcular el 20% de la tasa metabólica de rutina (RMR). Para determinar la MMR, se utilizaron 10 organismos de cada temperatura de aclimatación los cuales fueron colocados individualmente en contenedores circulares de 47 cm de diámetro y 15 cm de profundidad con agua de mar a la temperatura de aclimatación y oxigenación constante. Los organismos fueron inducidos a nadar a través la persecución con una red a una velocidad constante por un tiempo de 5 min de acuerdo con Roche et al., (2014) y Norin et al., (2014). Al terminar el tiempo de persecución, los organismos fueron colocados en el sistema de respirometría para realizar la medición de consumo de oxígeno en un lapso de tiempo de 5 min. Los registros se anotaron cada 30 seg. El CAM se determinó al graficar la diferencia entre MMR y SMR.

2.4. Nutrición

2.4.1. Formulación de dietas

Las dietas se formularon y elaboraron en el área de producción de alimentos del Centro de investigación Biológica del Noreste - La Paz (CIBNOR).

Cada una de las harinas y el concentrado soluble de proteína fueron pesados y molidos en un pulverizador de alta eficiencia para obtener una reducción final de 200 µm, por otro lado los minerales y vitaminas fueron pesados y molidos en un molino de café electrónico. Una vez que los ingredientes sólidos fueron pesados y molidos se mezclaron en las proporciones indicadas con ayuda de una batidora industrial

agregando 20% de agua a cada mezcla. Al final se agregó la porción de aceite de hígado de bacalao para cada dieta.

Tabla 1. Formulación de dietas experimentales y composición proximal.

Ingredientes (g)	Dieta 7 (7% de lípidos)	Dieta 14 (14% de lípidos)	Dieta 21 (21% de lípidos)
Harina de sardina	32,55	36,00	38,58
Concentrado de proteína soluble de pescado	13,00	25,00	30,00
Pasta de soya	10,00	10,00	10,00
Gluten de maíz	24,64	9,02	2,00
Harina integral de trigo	15,18	9,21	3,27
Aceite de hígado de bacalao	0,20	2,83	5,22
Lecitina de soya	0,50	4,00	7,00
Ácido algínico	2,00	2,00	2,00
Pre-mezcla mineral	1,00	1,00	1,00
Pre-mezcla vitaminas	0,70	0,70	0,70
Cloruro de colina	0,13	0,13	0,13
Vitamina C Stay C	0,08	0,08	0,08
Antioxidante BHT	0,02	0,02	0,02
Total de formulación (g)	100,00	100,00	100,00
Humedad (%)	8.40	11.80	8.50
Proteína (%)	59.00	61.20	61.90
Extracto etéreo (%)	6.20	13.10	20.30
Fibra (%)	0.50	0.40	0.30
Ceniza (%)	9.20	10.40	11.00
Extracto libre de nitrógeno (%)	26.10	16.90	9.90
Energía (Cal/G)	4756.30	4978.90	5179.10

Una vez que se mezclaron los ingredientes, estos se pasaron a través de un molino de carne con el objetivo de formar los pellets de alimento. En este proceso el calor generado por la fricción de los componentes del molino con los componentes aglutinantes forman en la parte superficial del pellet un recubrimiento semi-cocido. Cada una de los alimentos formulados se colocó en un horno de convección a una temperatura de 40 °C durante 24 horas hasta obtener un porcentaje de humedad en el alimento de 8 a 12%. Una vez terminada su formulación se almacenaron a 4 °C hasta su administración.

2.4.2. Ensayos de nutrición bajo temperaturas óptimas y sub-óptimas.

Para los ensayos de nutrición se utilizaron 90 organismos con un peso promedio de 53 g. Estos se dividieron al azar en 6 estanques de 500 L ($n = 15$) con el objetivo de identificar la influencia de la temperatura y la asimilación de lípidos de la dieta en *Seriola lalandi*. Cada estanque contó con un suministro de agua de mar, oxigenación constante y un sistema de control de temperaturas antes referidas.

En tres de los seis estanques se mantuvo una temperatura de 26 ± 0.5 °C mientras que en los otros tres se disminuyó 1 °C por día hasta 20 ± 0.5 °C (Figura 3). Una vez comenzó el periodo de aclimatación a 26 °C y 20 °C se suministraron las dietas experimentales a una proporción diaria del 4% del peso de los peces dividido en dos raciones. El tiempo que duro el bioensayo fue de 30 días y la proporción de alimento diaria se incrementó a razón de la ganancia de peso cada semana.

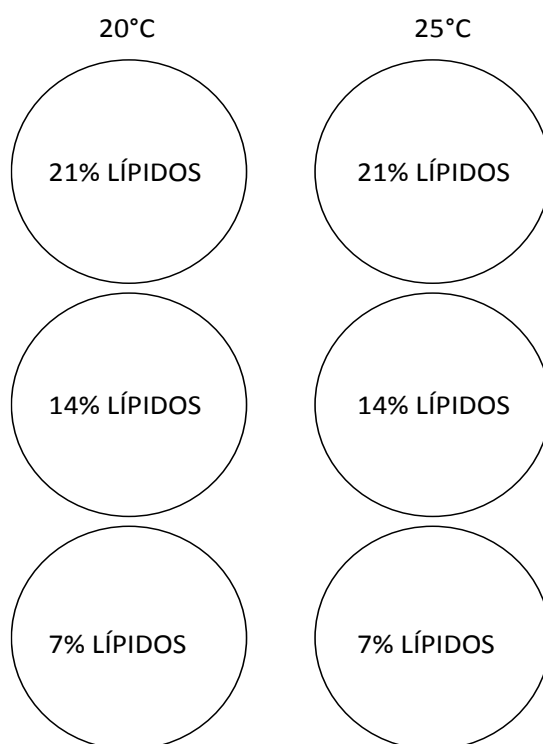


Figura 3. Diseño experimental para analizar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y microbiota intestinal bajo tres porcentajes de lípidos en dieta.

2.4.3. Tasa metabólica postprandial, excreción de amonio y razón atómico O:N

La tasa metabólica postprandial se calculó como la diferencia entre el consumo de oxígeno máximo obtenido después de la alimentación y el consumo de oxígeno basal (Rosas et al., 2003).

$$TMP = CO_2 \text{ máximo} - CO_2 \text{ basal} \quad (5)$$

Donde CO_2 máximo es la tasa respiratoria máxima obtenida después de la alimentación y CO_2 basal es la respiración de los animales mantenidos en ayuno por 20 horas.

Finalmente se tomaron muestras de agua antes y después de las respirometrías de la TMP con el objetivo de calcular la tasa de excreción de amonio (TEA). Las muestras de agua fueron procesadas a través del método de azul de indo-fenol para realizar una lectura de absorbancias en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

$$TEA = \frac{C_f - C_i}{W * T} * v \quad (6)$$

Donde C_f es la concentración de NH_4^+ final, C_i es la concentración de NH_4^+ inicial, W es el peso de los organismos en kilogramos, T es el tiempo en horas y V es el volumen de agua dentro de la cámara de respirometría al restarle el volumen de agua desplazada por el pez. Las unidades de la tasa de excreción de amonio son $mg NH_4^+ h^{-1} Kg^{-1}$.

Se obtuvo la razón atómica O:N mediante la utilización de los valores de consumo de oxígeno y la excreción de amonio de los organismos expuestos a las diferentes temperaturas de aclimatación. El cálculo se realizó mediante la siguiente ecuación descrita por Flores et al. (2008):

$$O:N = \frac{\text{Peso atómico } NH_4^+}{\text{Peso atómico de } O_2} * \frac{CO_2}{EA} \quad (7)$$

Donde CO es el consumo de oxígeno y EA es el amonio total excretado por los juveniles de jurel en cada condición.

2.4.4. Índices de crecimiento

Se llevó un seguimiento del peso a través de los ensayos de nutrición bajo temperaturas óptimas y sub-óptimas. Así mismo se realizó el análisis de la energía invertida en la producción de biomasa calculado a partir de los valores de crecimiento bajo los diferentes escenarios. Para calcular los diferentes índices de crecimiento se utilizaron los valores de crecimiento obtenidos a partir de la diferencia entre peso inicial y peso final de la siguiente manera:

- Porcentaje de ganancia en pesos (%GP) = $(\text{Ganancia de peso g} / \text{Peso inicial g}) * 100$.
- Tasa de crecimiento específica (TCE) = $[(\text{Ln}(\text{Peso final g}) - \text{Ln}(\text{peso inicial g}) / \text{n de días}) * 100$.
- Índice Visceral (IV) = $(\text{Peso de la viseras g} / \text{Peso total g}) * 100$.
- Índice bolsa biliar (IBB) = $(\text{Peso de bolsa biliar g} / \text{Peso total g}) * 100$.
- Índice hepatosomático (IHS) = $(\text{Peso de páncreas g} / \text{Peso total g}) * 100$.
- Factor de condición (FC) = $[\text{Peso total g} / (\text{Longitud total}^3)] * 100$.
- Tasa de conversión alimentación (TCA) = $(\text{Aumento en peso g} / \text{Consumo de alimento g})$.

2.5. Análisis de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi*

De los estanques de aclimatación se eligieron al azar cuatro peces para la toma de muestras de heces. Antes de comenzar con los ensayos de nutrición y aclimatación, cuatro organismo fueron sacrificados para tomar muestras de heces (muestras control). Por otro lado, al término del periodo de aclimatación se tomó la muestra de heces (20 a 80 mg) de cuatro organismo por tratamiento (n=24) para los análisis de metagenómica. Las muestras se almacenaran en tubos Eppendorf con 1 mL de alcohol y se almacenaron a -20°C para su posterior procesamiento.

Se realizó la extracción de ADN con ayuda del Buffer CTAB siguiendo el protocolo de extracción ADN metagenómico. Se utilizó un espectrofotómetro ND-1000 UV NanoDrop para realizar las cuantificaciones del ADN obtenido (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Del ADN obtenido, se amplificó a través de PCR la región V3 del gen 16S rRNA. Como protocolo para la amplificación se utilizó una temperatura de 95 °C para la desnaturalización (5 minutos), seguidos de 35 ciclos donde se intercalaron 3 temperaturas (unión, alineamiento y extensión) en 3 periodos de tiempo, dichas temperaturas y sus tiempos fueron: 95 °C/35 s, 56 °C/35 s y 72 °C/ 30 min, además de la extensión final a 72 °C/ 10 min. Las reacciones para PCR se prepararon con GoTaq Flexi DNA Polimerasa de Promega. Cada reacción fue de 12 µL más 0.5 µL de ADN. Como controles se utilizó una reacción con una ADN de una cepa bacteriana como control positivo y una reacción sin ADN como control negativo. Para verificar que solo hubiese una amplificación (región V3), se utilizó un gen de agarosa al 2%, las muestras se corrieron a 90 Watts durante 30 minutos.

2.5.1. Amplificación por PCR del gen 16S rRNA y secuenciación

La región V3 del gen 16S rRNA se amplificó por PCR con los cebadores propuestos por Huse et al. (2008); con adaptadores Illumina (San Diego, CA, EE. UU., en mayúsculas): 16S-V3_338f (TCG TCG, GCA GCG, TCA GAT, GTG, TAT, AGA, CAG, acy, cct, acg, ggr, ggc, agc, ag) y 16S-V3_533r (GTC TCG TGG, GCT, CGG, AGA, TGT, GTA TAA GAG ACA G tta ccg cgg cgg gca c). El programa de amplificación consistió en un paso de desnaturalización a 95 °C durante cinco minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 35 s, 56 °C durante 35 s y 72 °C durante 30 min, y una extensión final a 72 °C. por 10 min. Los amplicones de PCR se purificaron con perlas magnéticas Ampure XP y luego se añadieron los índices de Illumina para cada muestra en una segunda PCR, seguido de una segunda limpieza con perlas. Los amplicones de PCR finales se cuantificaron con el kit de ensayo de cuantificación BR dDNA para el fluorómetro Qubit, y se preparó un conjunto equimolar. Este conjunto se cuantificó con el ensayo de HS para Qubit y se ajustó a 4 nM para una desnaturalización adicional, dilución a 2 pM y secuenciación en una celda de flujo de salida media (300 ciclos) en un Illumina Miniseq.

2.5.2. Análisis bio-informático

Una vez que los archivos de secuencia se obtuvieron en formato FASTQ, se procesaron con el pipeline del departamento de genómica y metagenómica del CIAD, Mazatlán (https://github.com/GenomicaMicrob/metagenomic_pipeline). Primero, los archivos se procesaron con el script `pair-end_cleaner v.0.9.9` (https://github.com/GenomicaMicrob/pair-end_cleaner); las bases con una calidad phred inferior a Q20 y las bases ambiguas (n's) se eliminaron, las lecturas cortas se eliminaron (<140 bases) y también se recortaron a no más de 150 bases con CUTADAPT (Martin, 2011). Las secuencias de pares restantes se ensamblaron con PEAR para una longitud de ensamblaje mínima de 170 bases, un máximo de 250 bases y un solapamiento mínimo de 10 bases. Las métricas de diversidad de alfas se calcularon con Chao 1 y Shannon-Wiener (para la evaluación de diferencias en riqueza de especies y diversidad específica). Las curvas de rarefacción se hicieron en base a cada muestra (datos no mostrados) y tratamientos. El análisis de coordenadas principales se hizo en base a los tratamientos. Los gráficos y las estadísticas se desarrollaron en Excel, pasado v3.14 y STAMPv 2.1.3 (<http://kiwi.cs.dal.ca/Software/STAMP>).

Las secuencias de Quimera se eliminaron con la secuencia de comandos `chimera_detector v.0.1.1` (https://github.com/GenomicaMicrob/chimera_detector); las secuencias limpias se compararon con la base de datos EzBioCloud con `vsearch` (Rognes et al., 2016), aquellas secuencias que tenían una coincidencia (en un 97% de similitud) en la base de datos, no se consideraron una quimera. Las secuencias limpias y sin quimeras se clasificaron con el guion `mg_classifier v.1.7.0` (https://github.com/GenomicaMicrob/mg_classifier). Las secuencias se agruparon en un 97% de similitud con `vsearch`, las secuencias centroides de cada grupo se clasificaron mediante la coincidencia con la base de datos EzBioCloud (Yoon et al., 2017) v.1.5 basada en los umbrales de nivel taxonómico propuestos por Yarza et al. (2014)

Se calcularon las métricas de diversidad alfa para Chao 1 y Shannon-Wiener (para la evaluación de las diferencias en la riqueza de especies y la diversidad específica). Las curvas de rarefacción se hicieron en base a cada muestra (datos no mostrados) y tratamientos. El análisis de coordenadas principales se hizo en base a los tratamientos. Los gráficos y las estadísticas se desarrollaron en Excel, pasado v3.14 y STAMPv 2.1.3 (<http://kiwi.cs.dal.ca/Software/STAMP>).

2.6. Estadística

Se realizó estadística descriptiva, así como un análisis de varianza o una prueba de Kruskal Wallis según la normalidad de los valores obtenidos en cada caso, de igual forma se realizó pruebas a posteriori como la prueba de Tukey (Valores de preferencia térmica gravitacional), Dunn (Valores de preferencia térmica aguda y valores de RMR, HMR, LMR) o Holm-Sidak (valores de tolerancia térmica y valores de MMR). Las pruebas estadísticas y los gráficos correspondientes se realizaron en el paquete estadística ZiGMA Plot 11.

Para el caso de los resultados de metagenómica, se utilizó el programa PAST3 para realizar las curvas de rarefacción, con el programa STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) se realizaron las pruebas paramétricas y no paramétricas con un nivel de confianza del 95%. Se realizó un ANOVA y una prueba de Tukey con los valores de abundancia de OTUs con ello se realizó la agrupación de OTUs y el análisis de componentes principales (PCA), Para realizar la comparación de las proporciones de secuencias (%) entre dos tratamiento se empleó una prueba de G y una prueba de Fisher.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Biología térmica

3.1.1. Preferencia térmica en un ciclo circadiano

Las temperaturas preferidas de *S. lalandi* durante un ciclo circadiano fueron de 22 °C a 28 °C (25 ± 1.01 °C; Figura 4). No se observaron diferencias significativas entre la preferencia térmica durante el día y la noche ($P > 0.05$). El comportamiento observado fue un constante desplazamiento a través de las diferentes temperaturas señaladas, además de evitar las temperaturas extremas; durante el ciclo nocturno se observó el mismo comportamiento termorregulador dentro del gradiente.

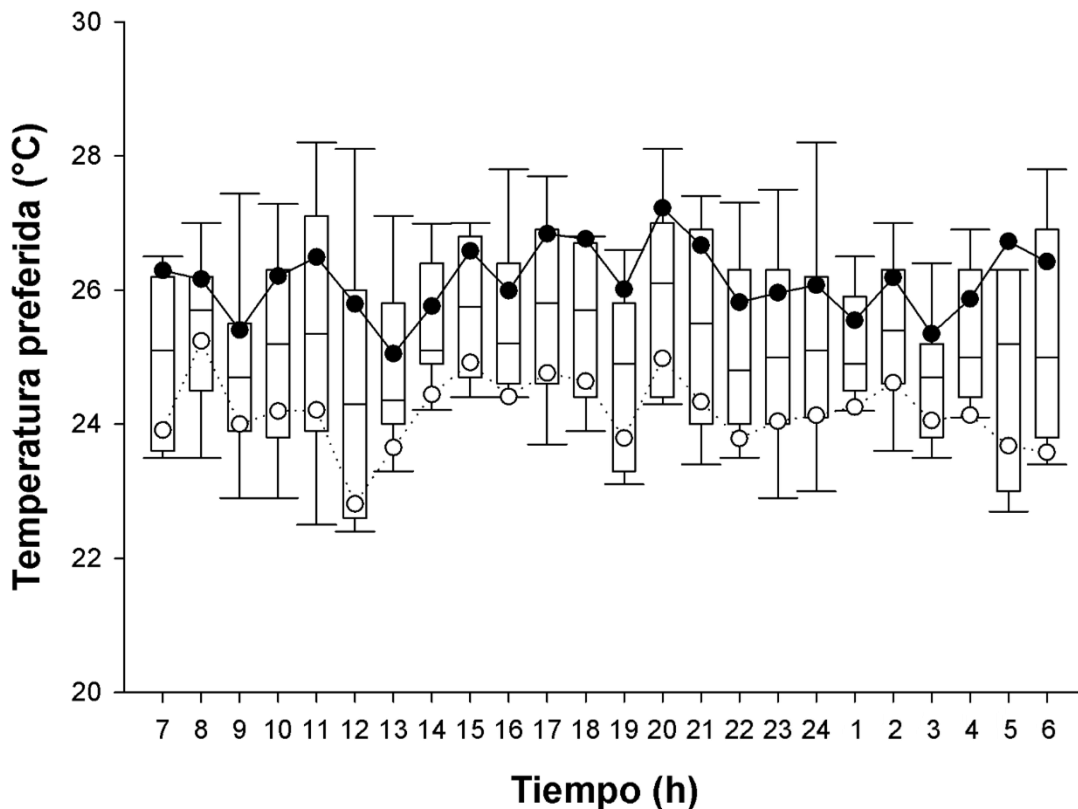


Figura 4. Preferencia térmica de *Seriola lalandi* durante un ciclo diurno obtenida a través del método gravitacional. La zona dentro de los boxPlot limitada por círculos representa los intervalos de confianza (95%) de la mediana. Las barras incluyen el 50% de la distribución de los organismos y las líneas verticales representan los cuartiles.

3.1.2. Preferendum térmico determinado a través el método agudo.

A través de un proceso de aclimatación térmica se determinó el preferendum térmico final de *S. lalandi* en 26 ± 1.6 °C (Figura 5). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas en las preferencias térmicas bajo las cinco temperaturas de aclimatación ($P < 0.05$). El comportamiento termorregulador observado fue la preferencia de temperaturas por arriba 20 y 23 °C, mientras que ocurrió lo contrario en los organismos aclimatados a 29 y 32 °C donde se observó una preferencia por temperaturas más frías; los organismo aclimatados a 26 °C prácticamente no modificaron su preferencia térmica.

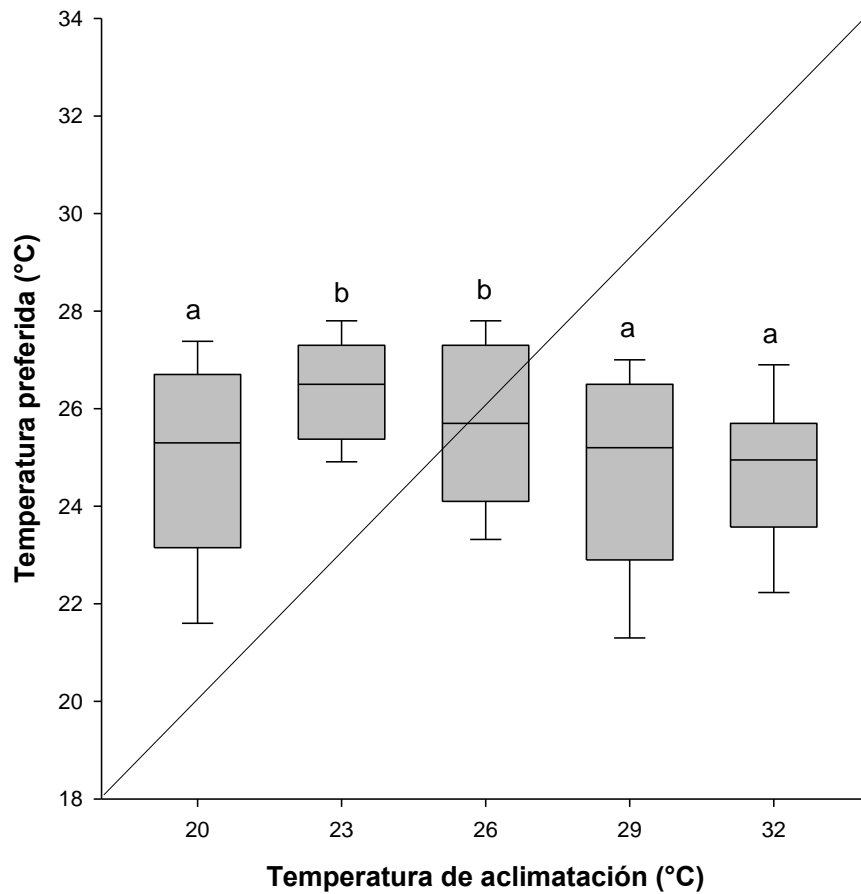


Figura 5. Comportamiento termorregulador de *S. lalandi* bajo diferentes temperaturas de aclimatación. La sombra dentro de los boxPlot limitada por círculos representa los intervalos de confianza (95%) de la mediana. Las barras incluyen el 50% de la distribución de los organismos y las líneas verticales representan los cuartiles. La línea con una inclinación de 45° representa el punto donde la preferencia térmica y la temperatura de aclimatación son iguales.

3.1.3. Tolerancias térmicas

La tolerancia térmica de *Seriola lalandi* bajo diferentes temperaturas de aclimatación mostró los siguientes valores de temperaturas críticas máximas: 34.2 ± 0.3 , 34.7 ± 0.2 , 35.5 ± 0.2 , 36.5 ± 0.1 y 36.9 ± 0.5 °C (media \pm Err est) respectivamente, mientras que los valores de temperatura crítica mínima fueron: 10.9 ± 0.3 , 12.1 ± 0.4 , 14.6 ± 0.5 , 15.7 ± 0.2 y 17.3 ± 0.5 °C. Tanto en los valores de TCM_{ax} como en los de TCM_{in} se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$; Figura 6).

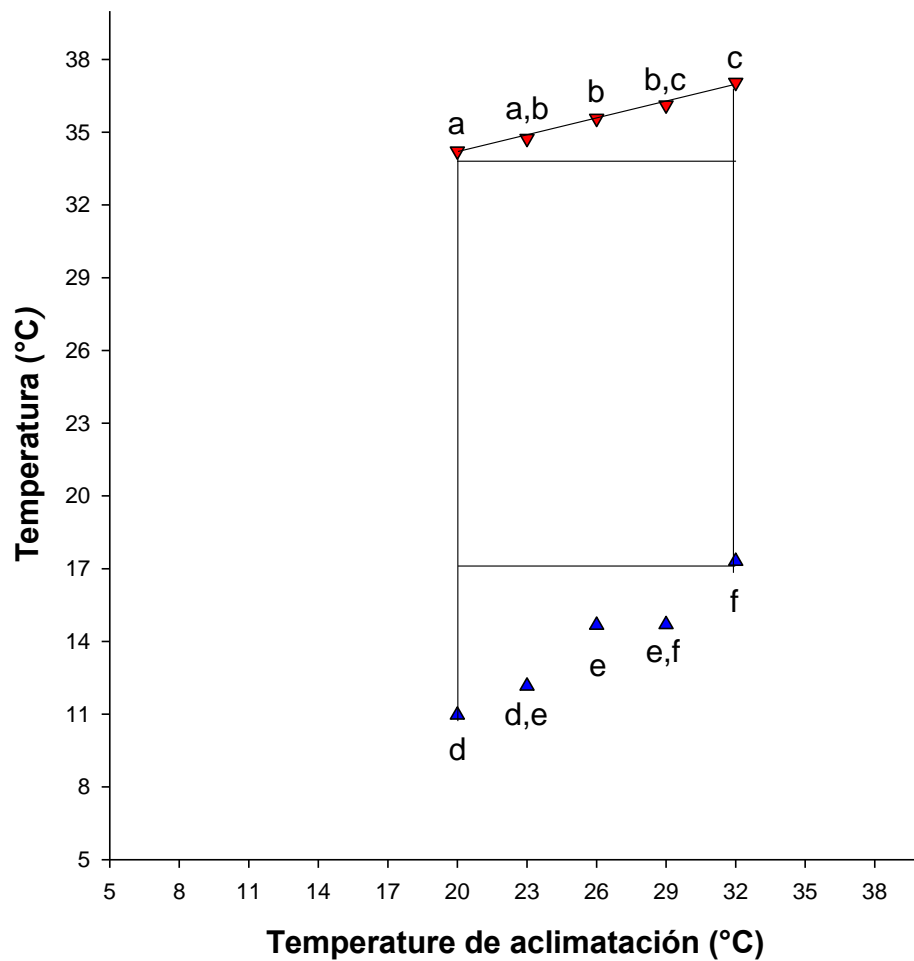


Figura 6. Temperaturas Críticas de *Seriola lalandi* representadas en un polígono térmico. El polígono térmico tiene un área total de 258 °C² mientras que el área de tolerancias adquiridas tiene 18 y 36 °C² respectivamente. Los valores de CT_{Max} y CT_{Min} están representados en Boxplot donde se encuentran 50% de los valores, y el resto de estos se representan en las líneas verticales.

Tabla 2. Tasa de respuesta a la aclimatación (ARR) de *S. lalandi* después del proceso de aclimatación (N=10).

ARR	Temperaturas de aclimatación (°C)		
	20-26	23-29	26-32
CTMin	0.62	0.60	0.45
CTMax	0.22	0.30	0.23

3.2. Respuestas metabólicas

3.2.1. Tasa respiratoria bajo las temperaturas de aclimatación

En la Figura 7 se muestra la tasa metabólica de rutina de *S. lalandi* bajo las diferentes temperaturas de aclimatación. El consumo de oxígeno de rutina aumento desde $390.06 \pm 14.7 \text{ mg O}_2\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$ en la temperatura de 20 °C hasta un máximo valor de $468.77 \pm 25.7 \text{ mg O}_2\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$ en 29 °C. En la temperatura de 32 °C se presentó una disminución del consumo de oxígeno de rutina con respecto a 29 °C el cual fue de $423.00 \pm 20.4 \text{ mg O}_2\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$, sin embargo no presenta diferencias estadísticas significativas con los valores de consumo de oxígeno en 29 °C y si con los que se presentaron en 20 °C, 23 °C ($409.87 \pm 17.5 \text{ mg O}_2\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$) y 26 °C ($409.98 \pm 18.2 \text{ mg O}_2\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$; $P < 0.05$).

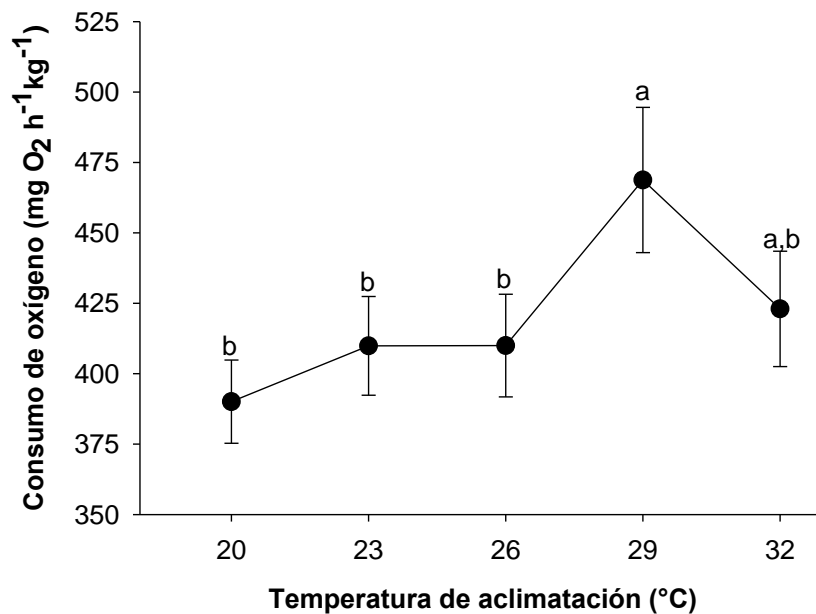


Figura 7. Consumo de oxígeno de rutina de *Seriola lalandi* bajo diferentes temperaturas de aclimatación (media ± err est). Diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) representadas con a, b.

Tabla 3. Coeficiente de temperatura (Q_{10}) de *S. lalandi* aclimatados a diferentes temperaturas (N = 15).

Temperatura	20-23	23-26	26-29	29-32
Q_{10}	1.17	1.00	1.56	0.70

3.2.2. Alcance aeróbico

Las MMR bajo las diferentes temperaturas de aclimatación presentaron los valores más altos en las temperaturas de 23 a 26 °C. En las temperaturas de aclimatación de 29 y 32 °C después del Chase se observó una reducción de las MMR, siendo significativamente menor en 32 °C ($P < 0.05$). Por otro lado el 20% de los valores de consumo de oxígeno de rutina o RMR se presentaron estables sin diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$; Figura 8); El alcance aeróbico determinado a través del método de Chase presentó el máximo valor en 26 °C.

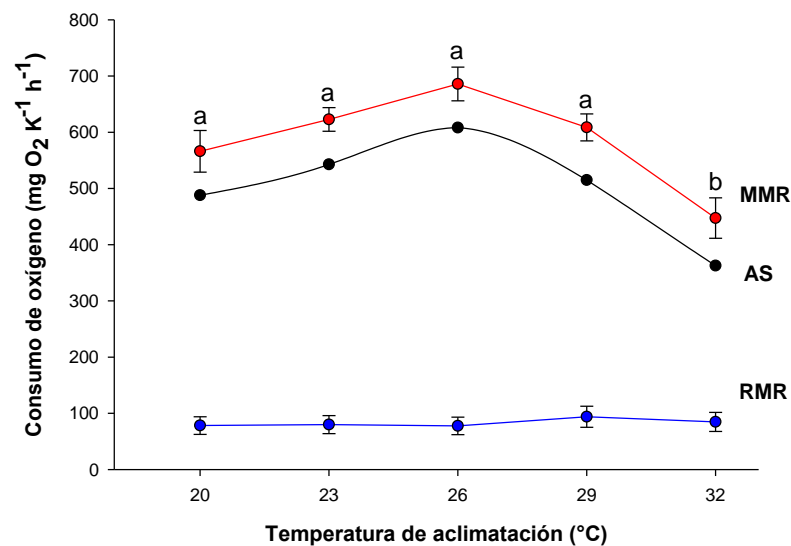


Figura 8. Consumo de oxígeno de *Seriola lalandi* después de haber sido estimulados con persecución (Chas). MMR (Maximum Metabolic Rate) y 20% de la RMR (Routine metabolic rate) = Media \pm Es. AS (Aerobic Scope)

Las HMR menores se presentaron a las temperaturas de 30.7, 32.8 y 33.2 °C (correspondientes a las temperaturas de aclimatación de 20, 29 y 32 °C), mientras que los valores significativamente más altos se observaron a las temperaturas de 31.2 y 31.9 °C (correspondientes a las temperaturas de aclimatación de

23 y 26 °C). Por otro lado los consumos de oxígeno después de exponer a los organismos a TIMRmin no presentaron diferencias estadísticas significativas ($P = <0,001$; Figura 9).

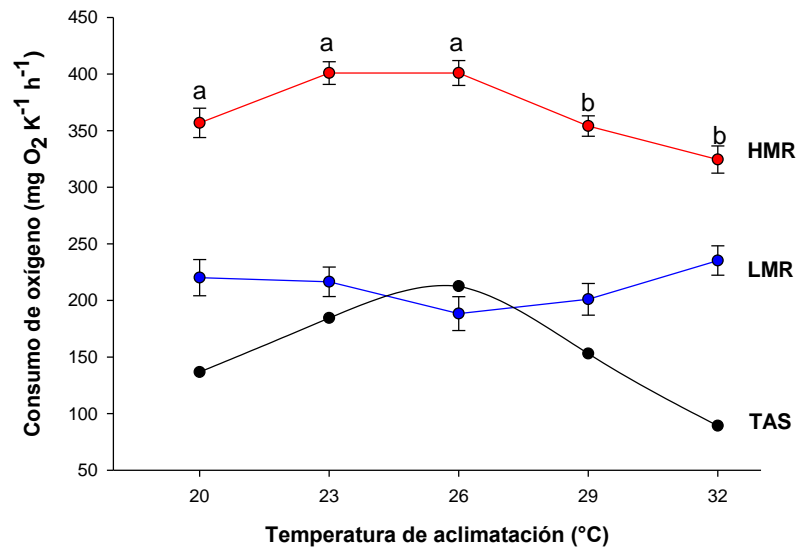


Figura 9. Consumo de oxígeno de *Seriola lalandi* después de haber sido estimulados con TIMRmax o TIMRmin. ESMR (Escape Metabolic Rate) y REMR (Rest Metabolic Rate) = media \pm Es. TAS (Thermic Aerobic Scope).

El alcance aeróbico determinado a través de las temperaturas (TIMR) presentó el máximo valor en los organismos aclimatados a 26 °C.

3.3. Efecto de la aclimatación térmica en el crecimiento

La ganancia de peso de *S. lalandi* durante los procesos de aclimatación se pueden observar en la Tabla 4. El peso promedio inicial de los organismos fue de 23.9 g. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los pesos finales ($P > 0.05$) sin embargo es posible distinguir menor ganancia en peso en los organismo aclimatados a las temperaturas de 29 y 32 °C.

Tabla 4. Peso de *Seriola lalandi* bajo diferentes temperaturas de aclimatación.

<i>Tratamiento</i>	<i>Pi (g)</i>	<i>Pf (g)</i>	<i>GP</i>	<i>%GP</i>	<i>TCE</i>	<i>TCA</i>
20 °C	23.6	45.0	21.40	90.68	3.07	0.93
23 °C	22.8	44.8	22.00	96.49	3.22	0.91
26 °C	24.2	45.4	21.20	87.60	3.00	0.94
29 °C	24.8	39.5	14.70	59.27	2.22	1.36
32 °C	24.1	40.6	16.50	68.46	2.48	1.21

3.4. Efectos del porcentaje lipídico de la dieta en el crecimiento de *Seriola lalandi*

Con respecto a la ganancia en peso de los juveniles de *S. lalandi* alimentados con diferentes porcentajes de lípidos en dieta, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso final de los organismo aclimatados a 20 °C, donde los peces con mayor ganancia de peso se alimentaron con la dieta formulada con 14% de lípidos, seguidos por los organismos alimentados con la dieta de 21% de lípidos y por último los de menor ganancia en peso fueron los organismos alimentados con la dieta con 7% lípidos (Tabla 5).

Tabla 5. Peso de los juveniles de *Seriola lalandi* bajo los tratamientos de nutrición y aclimatación térmica

<i>T (C°)</i>	<i>Li (%)</i>	<i>Pi (g)</i>	<i>Pf (g)</i>	<i>%GP</i>	<i>TCE</i>	<i>IV</i>	<i>IBB</i>	<i>IHS</i>	<i>FC</i>	<i>TCA</i>	<i>TEA</i>
20	7	53.5	65.6 ^c	22.7 ^c	0.68 ^c	5.65 ^b	0.44*	0.85	0.96	2.63 ^c	4.0 ^{b*}
	14	55.0	95.8 ^d	74.2 ^d	1.85 ^d	5.57 ^{bc*}	0.22	0.82*	1.01*	0.78 ^d	12.9 ^c
	21	55.7	79.0 ^{cd*}	42.1 ^{cd*}	1.17 ^{e*}	5.67 ^{c*}	0.22*	0.85	1.02	1.36 ^{d*}	11.1 ^{c*}
26	7	52.0	63.0 ^a	22.6 ^a	0.68 ^a	5.88 ^a	0.23*	0.80	0.93 ^a	2.74 ^a	14.7 ^{a*}
	14	50.5	83.5 ^b	65.3 ^b	1.68 ^b	4.83 ^{a*}	0.19	0.67*	1.15 ^{b*}	0.97 ^b	14.5 ^a
	21	56.5	94.0 ^{b*}	64.8 ^{b*}	1.67 ^{b*}	3.84 ^{a*}	0.16*	0.69	0.95 ^a	0.87 ^{b*}	17.8 ^{a*}

Las comparaciones de cada variable se realizaron entre los grupos de cada temperatura por separado. T – Temperatura de aclimatación en °C; Li – Porcentaje de lípidos en la dieta; Pi-Peso inicial (n=14, $P = 0.09$); Pf-Peso final (n= 18, $P = <0,001^*$); %GP- Porcentaje de Ganancia en peso; TCE- Tase de crecimiento específico; IV-Índice visceral (n=6, $P = 0.009^*$); IBB - Índice Bolsa Biliar (n = 6, $P = 0.231$); IHS – Índice hepatosomático (n = 6, $P = 0.385$); FC – Factor de crecimiento (n = 6, $P = 0.548$), TCA-Tasa de Conversión Alimenticia; TEA – Tasa de Excreción de Amonio.

Por otra parte, la ganancia en peso de los organismos aclimatados a 25 °C únicamente mostraron diferencias estadísticas significativas los organismos alimentados con la dieta de 7% donde se presenta la ganancia en peso menor.

3.4.1. Incremento de la tasa metabólica postprandial (ITMP)

En los organismos aclimatados a 20 °C se observó el ITMP en los primeros 40 min después de la alimentación donde se registraron los valores de 84.69, 370.356 y 221.88 mgO₂h⁻¹Kg⁻¹ respectivamente; mientras que en los organismos aclimatados a 26 °C registraron los valores máximos después de la alimentación de 148.07, 249.21 y 256.01 mgO₂h⁻¹Kg⁻¹ respectivamente (Figura 10).

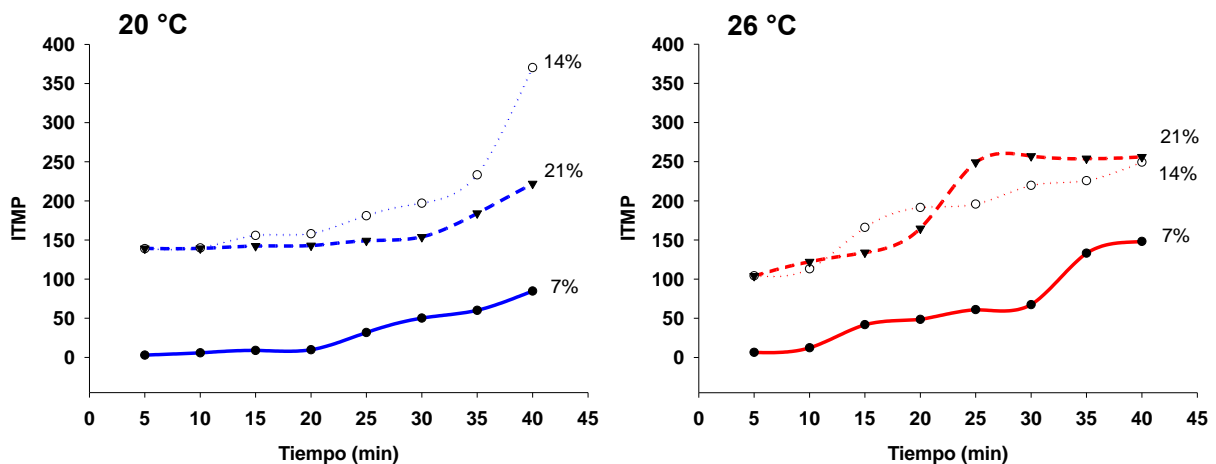


Figura 10. Incremento de la Tasa Metabólica Postprandial (ITMP) observado en los organismos sometidos a las temperaturas de aclimatación de 20 °C (Azul) y 26 °C (Rojo) y tres dietas con diferente proporción de lípidos (7, 14, 21%).

3.5. Microbiota bacteriana intestinal

3.5.1. Resultados de pirosecuenciación del gen 16S rRNA

Después de filtrar por calidad y tamaño, se clasificaron 833,912 secuencias del gen 16S rRNA en 2,405 OTU. Se obtuvieron un total de 744 OTUs *de novo* con un porcentaje de identidad mayor al 97% (607,231 secuencias a nivel de género y especie); 976 OTUs con un porcentaje de identidad de 96,9 a 94,1% (169,577

secuencias a nivel de familia y género); 568 OTUs de 94.2 a 86.6% (51,868 secuencias por orden y nivel familiar); y 177 OTUs de 86.4 a 75.1% (4,844 secuencias asociadas con niveles más altos que Clase). La secuenciación se llevó a cabo asignando individualmente un par de adaptadores específicos a cada muestra (cuatro muestras por siete tratamientos = 28 muestras); sin embargo, para el análisis estadístico, se promediaron los datos de cada tratamiento. Se obtuvo una media de 41,263 secuencias por tratamiento dietético a 26 °C (que representa el 60% de las secuencias totales). Los tratamientos a 20 °C mostraron diferentes proporciones de secuencias relacionadas con el tipo de dieta suministrada; las muestras de heces de los peces alimentados con 14% de lípidos, presentaron 9,266 secuencias (4,4% de las secuencias totales), las muestras de heces de los peces alimentados con 7% presentaron 22,632 secuencias (8,1% de las secuencias totales); y las muestras de heces de los peces alimentados con 21% presentaron 35,466 secuencias (12,7% de secuencias totales). El tratamiento de control presentó un total de 29,485 secuencias que representaban el 15% de las secuencias totales. Cuando los datos se analizaron por tratamiento, se encontró el número mayor de secuencias en T26L07 y T20L21 (Figura 11).

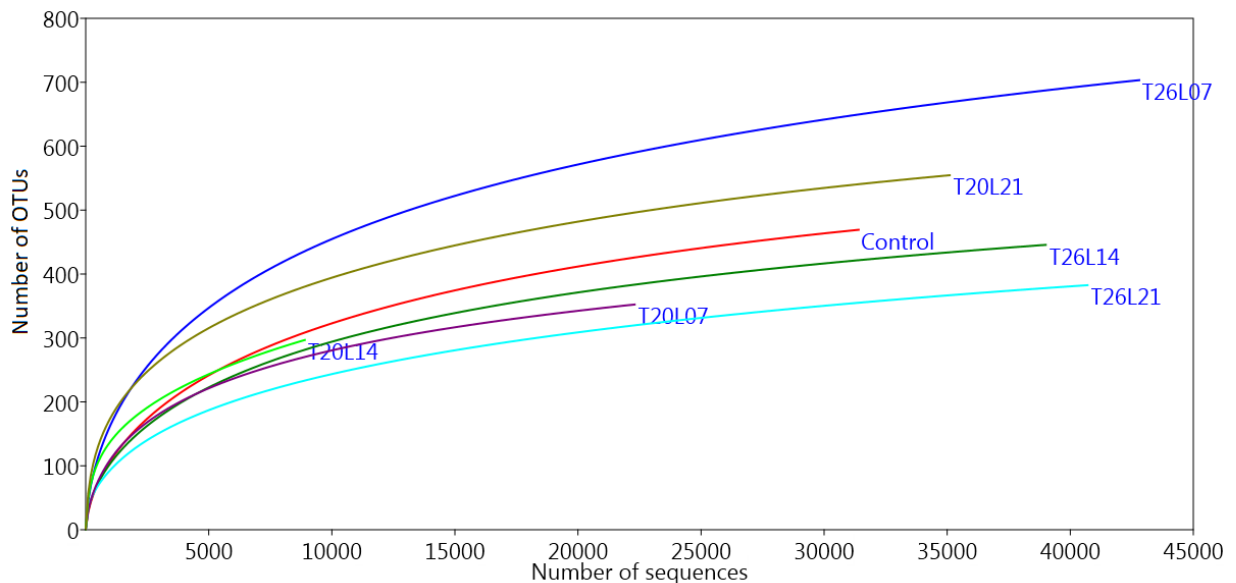


Figura 11. Curvas de rarefacción que muestran el número de OTUs identificados en las heces de *S. lalandi* (en el 97% de la identidad de secuencia del gen 16S rRNA) como una función del número de secuencias analizadas. T: temperatura de aclimatación de cada tratamiento; L: Porcentaje de lípidos en la dieta para cada tratamiento.

La diversidad específica de los tratamientos T20L21, T20L14 y T26L07 fue mayor en comparación al resto de los tratamientos (Figura 12). Sin embargo, los valores de diversidad en cada caso son considerados

como valores que representan alta diversidad de especies (< 3). Los índices de diversidad alfa (Chao1, Shannon-Wiener) indicaron diferencias estadísticas entre T26L07 y T20L21 en comparación con el resto de los tratamientos.

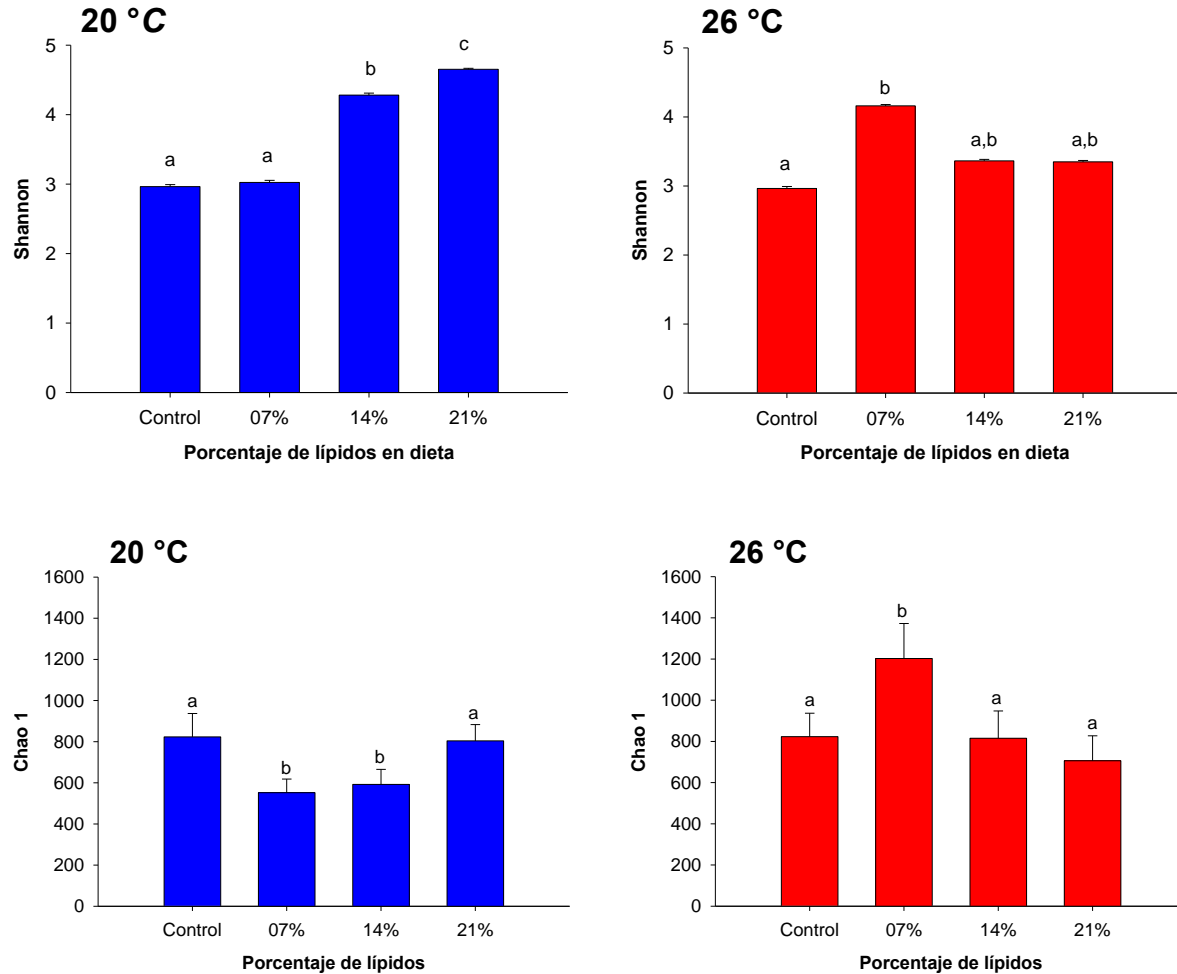


Figura 12. Índices de Chao 1 y Shannon-Wiener sobre la microbiota asociada a heces de *S. lalandi*, que muestra la complejidad de la comunidad microbiana asociada con las heces de *Seriola lalandi* después de la aclimatación y las diferentes dietas proporcionadas.

La riqueza específica de especies de los OTUs evaluados con el índice Chao1 indicó que los tratamientos con el mayor número de especies se registraron a la temperatura de aclimatación de 26 °C en juveniles alimentados con la dieta con 7% de lípidos incluidos. Los peces aclimatados a 20 °C alimentados con 21% de lípidos, así como los peces aclimatados a 26 °C alimentados con 14 y 21% de lípidos, presentaron una riqueza de especies similar que el tratamiento de control. Por otro lado, los peces de los tratamientos T20L07 y T20L14 presentaron una riqueza de especies menor al tratamiento control (Figura 12).

3.5.2. Microbiota asociado con heces de *Seriola lalandi*

Los phyla *Proteobacterias* (92.1%), *Actinobacteria* (6.2%), *Bacteroidetes* (1.0) y *Firmicutes* (0.6%) fueron identificadas en los organismos bajo la condición control. La microbiota fecal de los peces examinados en condiciones control estuvo dominada por las familias *Alcaligenaceae* (45.4%), seguida de *Xanthomonadaceae* (12.6%), *Pseudomonadaceae* (7.7%), *Brucellaceae* (5.8%), *Microbacteriaceae* (5.3%), *Phyllobacteriaceae* (5.1%). Cuando se consideraron los OTUs al nivel taxonómico del género, las secuencias más abundantes se clasificaron como *Achromobacter*, *Photobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Ochrobactrum*.

En las muestras fecales de los peces aclimatados a 26 °C alimentados con 7% de lípidos incluidos así como en los organismo en condiciones control, los OTUs dominantes se clasificaron como *Alcaligenaceae* (27%); sin embargo, en este tratamiento la familia *Enterobacteriaceae* (17%) fue más abundante que en las muestras fecales de control; también se identificaron *Microbacteriaceae* (5%) y *Pseudomonadaceae* (4%). En las heces de los peces aclimatados a 26 °C alimentados con 14 y 21% de lípidos, los OTUs y sus abundancias relativas fueron muy similares. Las familias predominantes se clasificaron como *Alcaligenaceae* (31-34%), *Enterobacteriaceae* (20-27%), *Xanthomonadaceae* (10-11%), *Pseudomonadaceae* (4-6%) y *Microbacteriaceae* (3-5%, Figura 16). En el nivel taxonómico del género, las secuencias más abundantes pertenecían a *Achromobacter* para T26L07, T26L14 y T26L21; *Leifsonia* para T26L07, T26L14 y T26L21; *Ochrobactrum* para T26L07; *Stenotrophomonas* para T26L14 y T26L21; *Citrobacter* para T26L14 y T26L21; *Pseudomonas* para T26L14 y T26L21; y *Achromobacter* para T26L14.

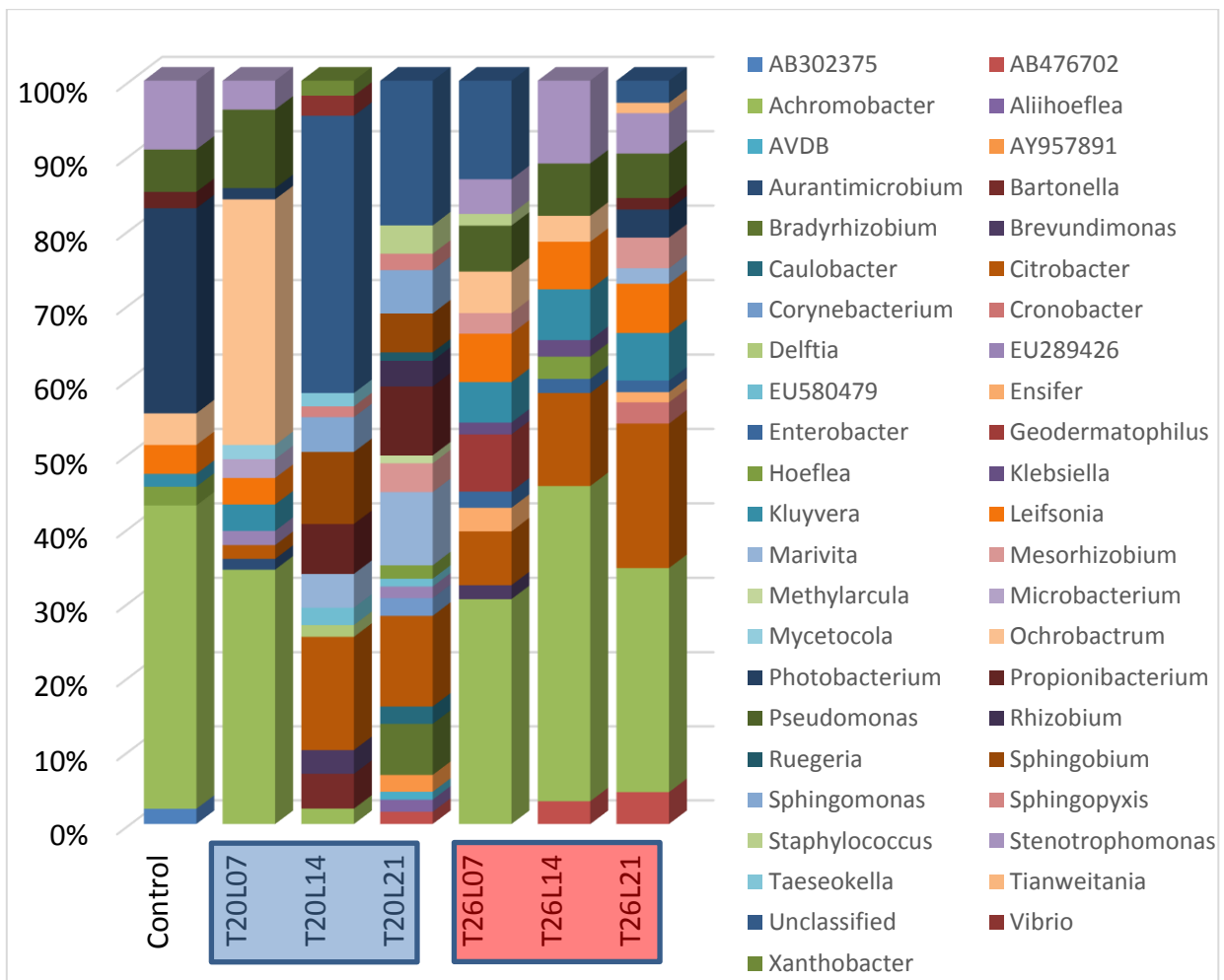


Figura 13. Abundancia relativa (%) de los principales géneros bacterianos observados en las heces de *Seriola lalandi* según la temperatura de aclimatación 20 °C y 26 °C . Solo están representadas las familias con abundancia superior al 1% en cada tratamiento.

En las muestras T20L07, los OTUs se asociaron con Alcaligenaceae que mantuvieron su proporción relativa (27%); Brucellaceae (26%) aumentó su proporción con respecto a los tratamientos a 26 °C; Se identificaron Pseudomonadaceae (9%), Enterobacteriaceae (7%), Microbacteriaceae (7%) y Xanthomonadaceae (4%). En las muestras T20L14 y T20L21, la familia Alcaligenaceae mostró la menor abundancia que en el resto de los tratamientos (2 a > 1%). Las familias dominantes en T20L14 fueron Sphingomonadaceae (27%) y Enterobacteriaceae (12%), mientras que para T20L21 las familias dominantes fueron Enterobacteriaceae (17%), Rhodobacteraceae (11%) y Sphingomonadaceae (9%, Figura 13). Finalmente, el género predominante fue *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Leifsonia* en T20L07; *Propionibacterium*, *Sphingobium*, *Bartonella*, *Sphingomonas* en T20L14; *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Marivita* y *Mesorhizobium* en T20L21.

Los OTUs se identificaron como presentes en cualquier grupo a un nivel estadístico significativo; aquellas familias más abundantes a 26 °C fueron *Pseudomonadaceae* ($P = 0.017$), *Alcaligenaceae* ($P = 5.20e-3$), *Microbacteriaceae* ($P = 0.025$) y *betaproteobacteria* no clasificada ($P = 1.82e-3$), en comparación con los tratamientos en 20 °C donde los más abundantes fueron *Saprospiraceae* ($P = 0.030$), *Comamonadaceae* ($P = 5.14e-3$) y *Micavibrio* ($P = 0.017$) (Figura 13).

3.5.3. Efecto de la temperatura sobre la microbiota fecal de *Seriola lalandi*

La comunidad microbiana fecal de los peces aclimatados a 20 °C mostraron menor similitud entre taxones a nivel de género en comparación a la comunidad microbiana fecal de los peces aclimatados a 26 °C. Los OTUs de los tratamientos a 26 °C se agruparon en su mayoría, mientras que los tres tratamientos a 20 °C se dispersaron o se separaron en un cuadrante diferente (Figura 14).

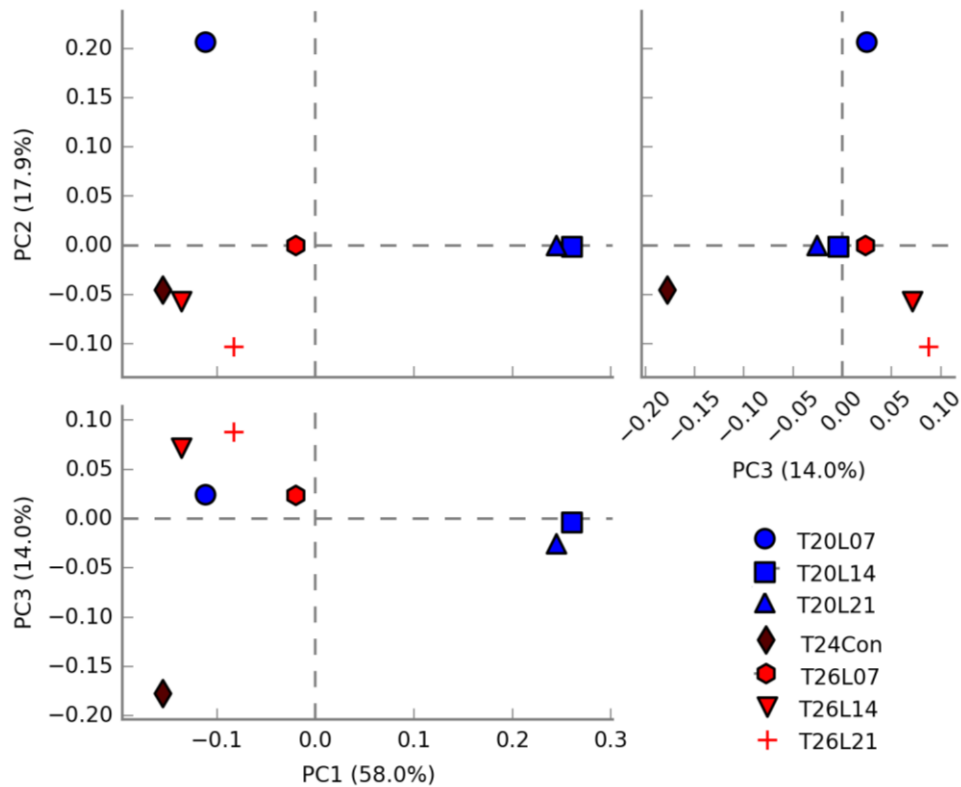


Figura 14. Análisis de componentes principales (PCA) de los OTUs identificados en las heces de *Seriola lalandi*.

3.5.4. Efectos de la porción de lípidos en la dieta sobre la microbiota fecal de *Seriola lalandi*

Las muestras fecales de peces en la condición de control tenían OTUs correspondientes a *Achromobacter* y *Photobacterium* principalmente y en menor proporción de secuencias *Stenotrophomans* y *Leifsonia*. El género *Photobacterium* solo se identificó en gran proporción en el tratamiento control y en menor proporción en los tratamientos a 26 °C (Figura 15).

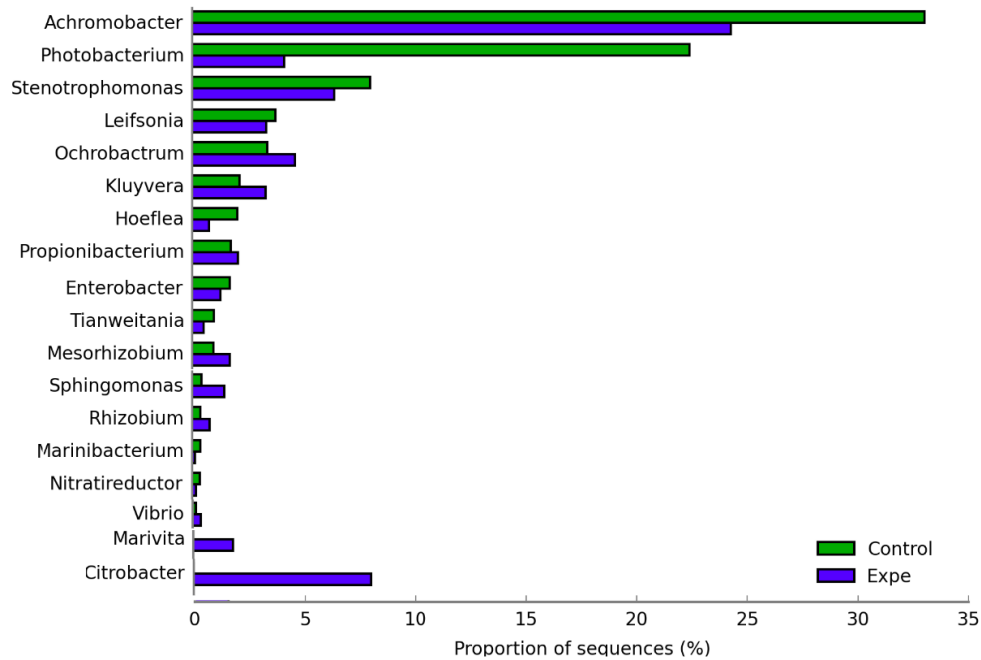
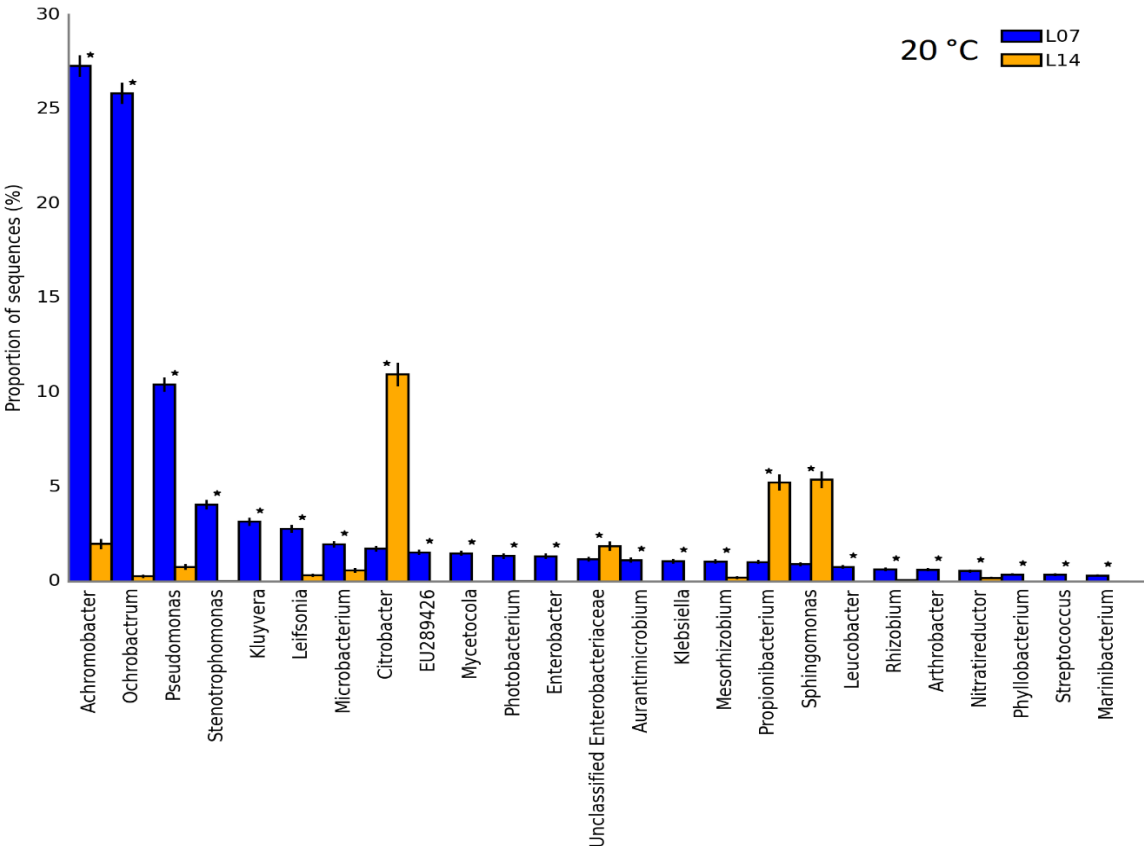
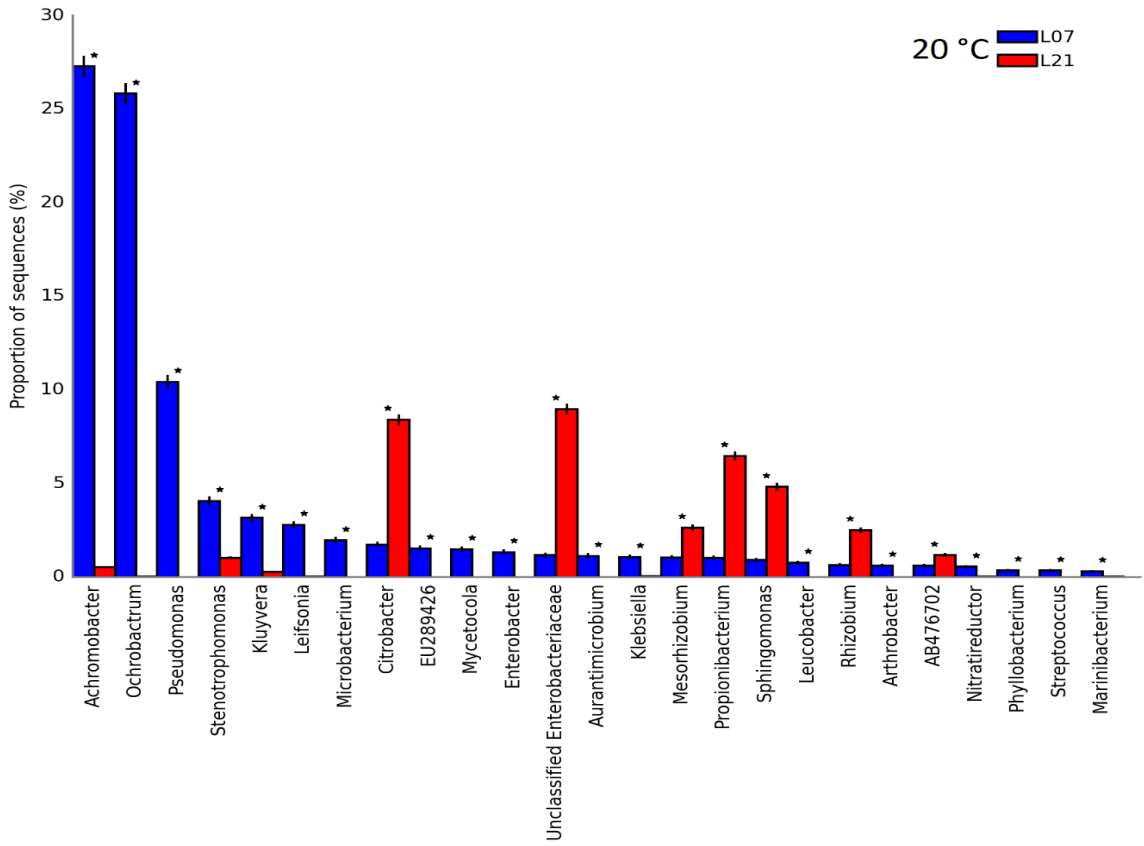


Figura 15. Comparación de los perfiles microbianos en la condición control y experimental. En Rojo se muestra la proporción de secuencias los OTUs identificados a nivel taxonómico de género en la condición control y en Azul los correspondientes a los tratamientos experimentales.

En 20 °C, los peces de los tratamientos de nivel bajo de lípidos (7%), presentaron un número significativo de OTUs pertenecieron a *Achromobacter*, *Ochrobactrum* y *Pseudomonas* las secuencias de estos tres géneros fueron significativamente menores o nulas en los tratamientos donde los peces fueron alimentados con las dietas de 14 y 21 % de lípidos. En el tratamiento de 14% lípidos se presentaron los OTUs pertenecientes a *Citrobacter*, *Propionibacterium* y *Sphingomonas* además de las familias *Sphingomonadaceae* y *Rhizobiales* sin clasificar. Y final mente en 21 % de lípidos se identificaron *Citrobacter*, *Propionibacterium*, *Marivita*, *Sphingomonas* y *Rhizobium* además de *Enterobacteriaceae* sin clasificar (Figura 16).



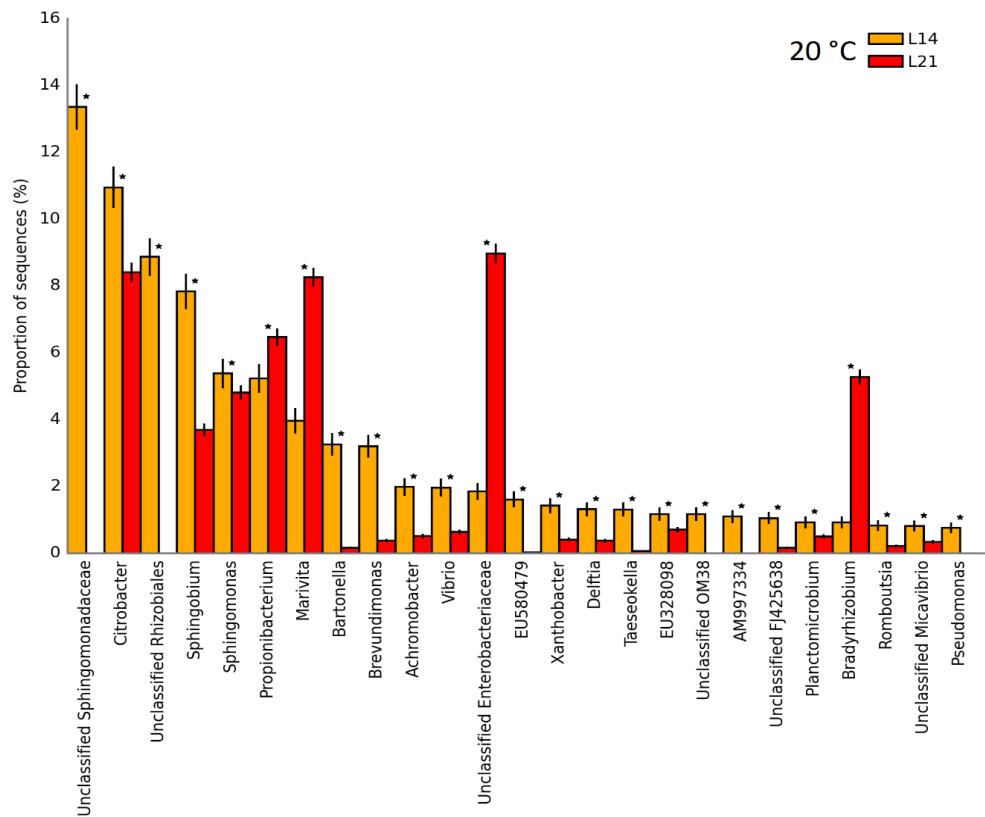
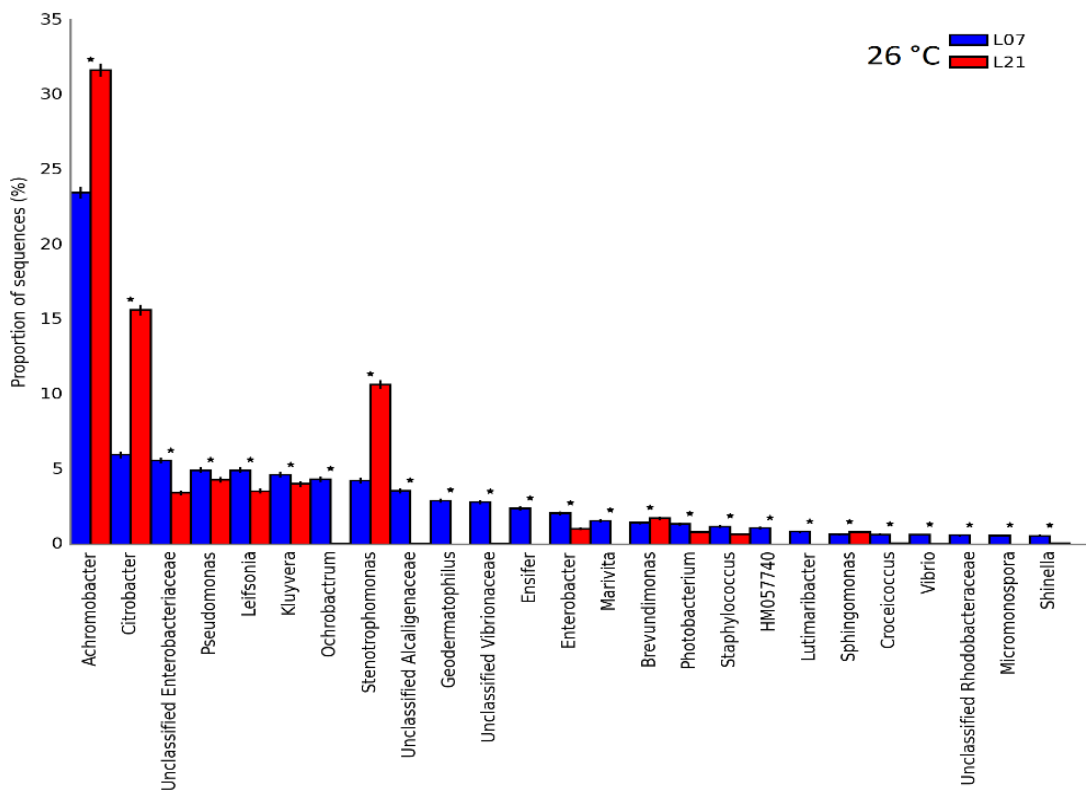
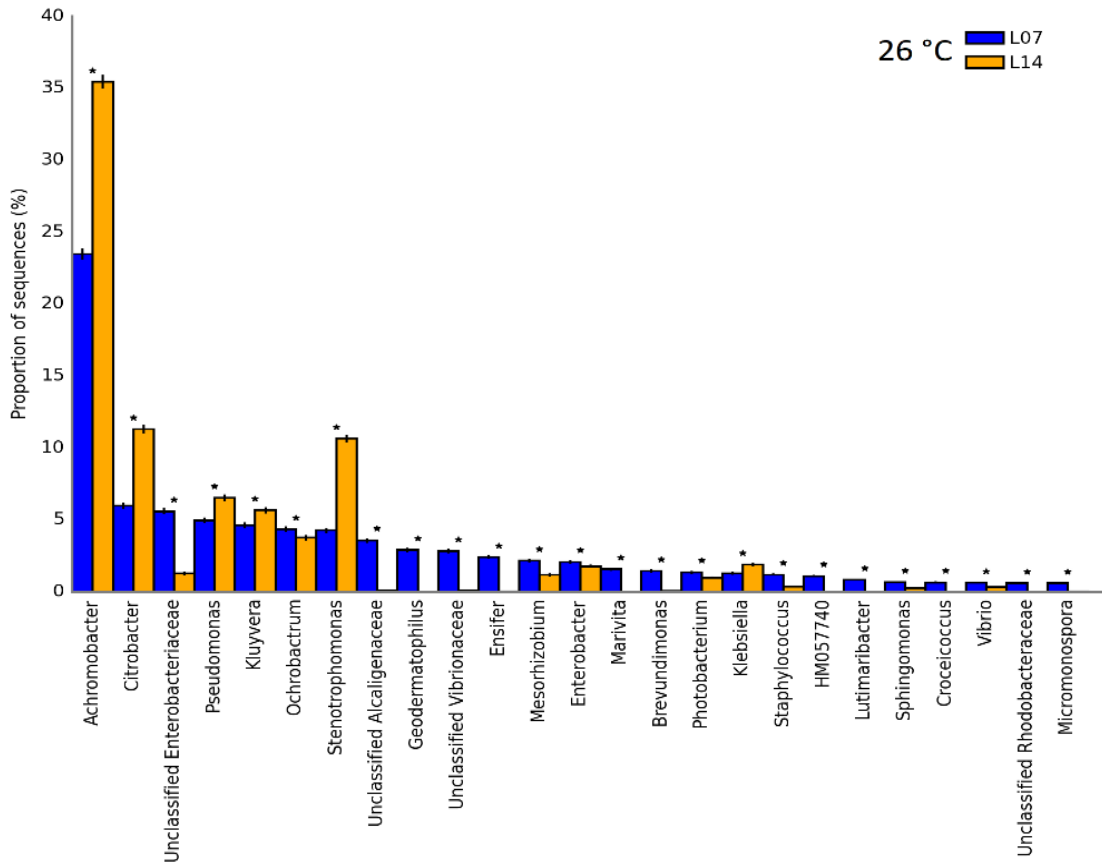


Figura 16. Comparación de los perfiles microbianos en 20 °C. En Azul se muestra la proporción de secuencias los OTUs identificados a nivel taxonómico de género en el tratamiento de inclusión de 7% de lípidos, en Anaranjado los correspondientes al tratamiento de 14 % de lípidos y en Rojo al correspondiente a 21 % de inclusión de lípidos.

En el tratamiento a 26 °C donde los peces fueron alimentados con la dieta de 7% de inclusión de lípidos, el género predominante fue *Achromobacter*, con menor proporción de secuencias se identificaron los géneros *Citrobacter*, *Pseudomonas* y a las familias *Enterobacteriaceae*, *Alcaligenaceae* y *Vibrionaceae* sin clasificar.

En los tratamientos a 26 °C donde se alimentaron los peces con una proporción de lípidos en la dieta de 14 y 21%, se identificaron perfiles microbianos muy parecidos siendo los géneros predominantes *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, todos ellos con un proporción de secuencias mayor que la que presentaron en el tratamiento de 26 °C donde los peces se alimentaron con la dieta de 7% de lípidos (Figura 17).



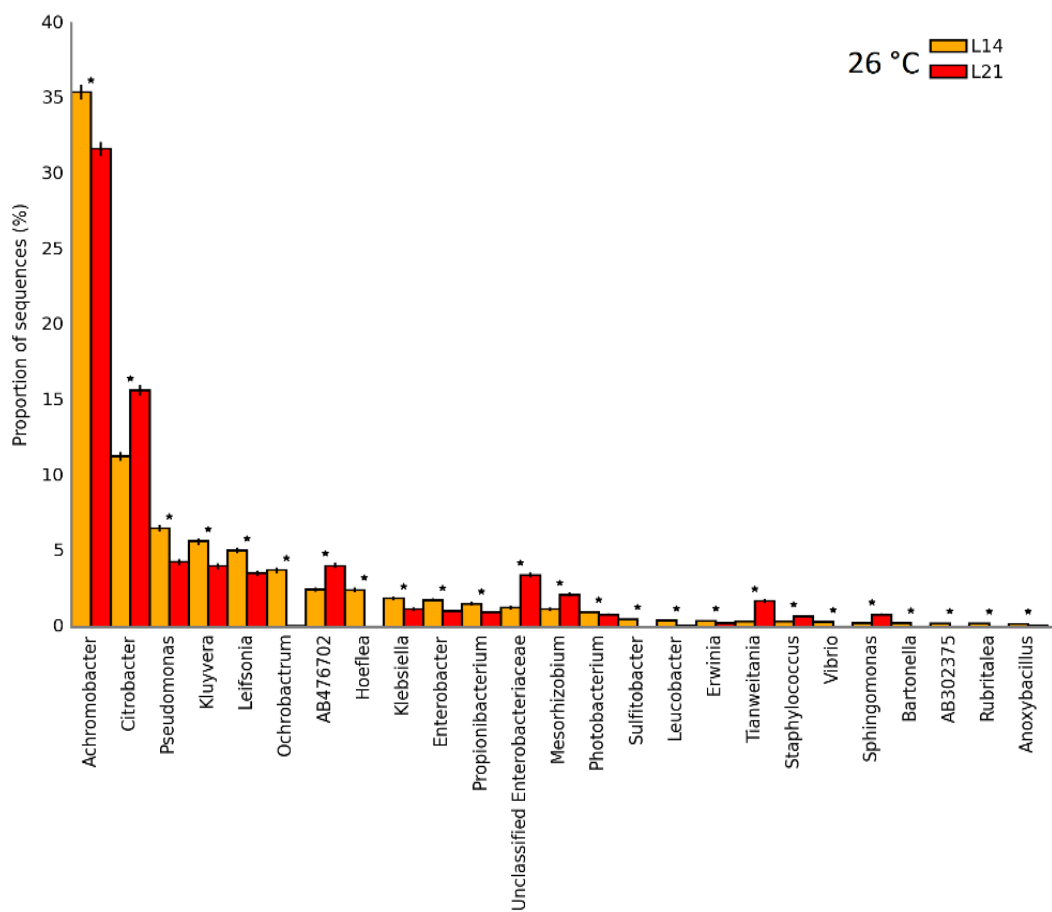


Figura 17. Comparación de los perfiles microbianos entre las distintas dietas en 26 °C. En Azul se muestra la proporción de secuencias los OTUs identificados a nivel taxonómico de género en el tratamiento de inclusión de 7% de lípidos, en Anaranjado los correspondientes al tratamiento de 14 % de lípidos y en Rojo al correspondiente a 21 % de inclusión de lípidos.

Capítulo 4. Discusión

Los organismos ectotermos como los peces manifiestan preferencias térmicas durante el día y la noche, esta preferencia térmica se ha determinado para organismos como *Canthigaster jactator* (26.5 °C a 26.9 °C), *Salmo trutta* (10.3 °C a 13.7 °C) y *Micropterus salmoides* (27.1 °C a 29,2 °C) (Reynolds y Casterlin, 1979, 1980; Díaz et al., 2007). Reynolds y Casterlin (1979) muestran que el mecanismo de regulación térmica a través del desplazamiento es indudablemente una respuesta adaptativa evolutivamente estable y de gran importancia para la supervivencia de estos organismos acuáticos. *S. lalandi* no presentó diferencias significativas entre la preferencia térmica en el día y la noche lo que sugiere una disponibilidad de alimento en su hábitat en correlación a los hábitos de depredación los cuales son factores que se ha demostrado que influyen en este comportamiento termorregulador (Reynolds y Casterlin, 1979, 1980; Díaz et al., 2007). En el presente trabajo, los rangos de temperatura donde los juveniles nadaron haciendo movimientos exploratorios (22-28 °C) son consistentes con las temperaturas en las que *S. lalandi* se ha ubicado en el Pacífico mexicano (23-28°C) durante los periodos del año donde se registraron las temperaturas más calientes (Avilés-Castelló, 2004).

Después del proceso de aclimatación, la preferencia térmica de *S. lalandi* se vio significativamente afectada. Aunque los juveniles se mantuvieron a una temperatura de aclimatación estable (20, 23, 26, 29 y 32 °C) durante 21 días, presentaron temperaturas preferidas de 25 °C y 26 °C. Este hecho podría indicar la presión selectiva ejercida por los requerimientos fisiológicos y metabólicos sobre el comportamiento de *S. lalandi* en cada temperatura de aclimatación. En diferentes trabajos se ha señalado que los peces presentan una preferencia térmica de acuerdo con sus requerimientos fisiológicos y metabólicos a pesar de la reciente condición térmica que experimentaron (Kellogg and Gift, 1983; Ilnat and Bulkley, 1984; Deacon et al., 1987; Díaz et al., 2007; McMahon et al., 2008; Schram et al., 2013). En este contexto, el comportamiento termorregulador se considera como un proceso adaptativo que permite a los peces, bajo diferentes condiciones térmicas, desplazarse a una temperatura más adecuada para el desempeño fisiológico y metabólico; por ello se ha relacionado esta preferencia térmica a la temperatura óptima para el crecimiento (Jobling, 1981; Kellogg and Gift, 1983; Schram et al., 2013). Se ha reportado la temperatura preferida final de peces como *Micropterus salmoides* (TP 29 °C), *Oncorhynchus clarkii lewisi* (TP 14,9 °C), *Oncorhynchus mykiss* (TP 14.8 °C), *Macrobrachium tenellum* (TP 32.2 °C) (Díaz et al., 2007; McMahon et al., 2008; Rodríguez et al., 2012); en estos estudios, se determinó que la temperatura final preferida y la temperatura óptima de crecimiento son temperaturas cercanas entre sí. Por otro lado, trabajos como Dowd et al., (2006) o Díaz et al., (2007) determinaron que el valor Q₁₀ más bajo determinado del consumo

de oxígeno bajo diferentes temperaturas de aclimatación, representa el ambiente térmico donde se realizó la mejor adaptación para mantener el metabolismo respiratorio de los peces marinos lo que fue evidenciado de *S. lalandi* con el valor de $Q_{10} = 1$ en las temperaturas de 23 a 26 °C; esto indica que no fue requerida una compensación o aumento respiratorio significativo en el rango de temperaturas de 23 a 26 °C lo que permitió el mayor crecimiento somático observado en los juveniles de *Seriola lalandi* en el rango de temperaturas de 23-26 °C en correspondencia con la temperatura preferida final (26 °C).

Por otro lado, el valor más bajo de Q_{10} (0.70) evidenció que *S. lalandi* presenta una menor tolerancia térmica al aumentar el metabolismo respiratorio en el rango de temperaturas de 29 a 32 °C; esto implicó un aumento considerable en la tasa metabólica (compensación metabólica) que influyó en el presupuesto de la energía y la homeostasis de los juveniles de *S. lalandi* lo que ocasionó menor porcentaje de crecimiento en las temperaturas de aclimatación de 29 y 32 °C.

En este trabajo, se identificó un incremento de los valores de temperaturas críticas con respecto al incremento de las temperaturas de aclimatación, sin embargo, se identificó menor tolerancia térmica después del periodo de aclimatación en relación con el aumento en la temperatura ya que se determinó una menor área de tolerancia adquirida en respuesta a las TC_{Max} (18 °C²) en comparación con la respuesta a las TC_{Min} (32 °C²). Este efecto podría indicar que el incremento en la temperatura afecta significativamente la fisiología y el metabolismo de *S. lalandi*. Se sabe que muchas de las especies tropicales y subtropicales viven en un ambiente con temperaturas cercanas a sus límites térmicos, lo que las hace susceptibles a eventos de aumento térmico anormal (Díaz et al., 2002; Das et al., 2005; Carveth et al., 2006; Emme and Bennett, 2009). Emme y Bennett (2009) exponen la relación entre la tolerancia térmica y el hábitat donde viven los peces marinos, enfatizando las diferencias entre los organismos que habitan en el manglares o especies asociadas al arrecife; estos autores indican que, aunque las condiciones térmicas del hábitat podrían determinar la tolerancia térmica, otros factores indirectos podrían ser la causa de los efectos negativos del cambio climático, como la degradación del hábitat o los cambios en la estructura trófica. Al igual que Emme y Bennett (2009), Carveth, et al., (2006), Das et al., (2005) y Díaz et al., (2002) entre otros, señalan que la tolerancia a la temperatura depende en gran medida de la historia térmica anterior así como el nicho térmico de las especies, este efecto se demostró en los juveniles de *S. lalandi* los cuales presentaron una tolerancia térmica restringida debido a que es una especie que habita las zonas pelágicas que son conocidas por su estabilidad térmica.

S. lalandi presentó un área total menor de la ventana térmica que las especies tropicales como *Apogon novemfascitus* (408 °C²), *Dascyllus aruanus* (442 °C²) y *Centropomus undecimalis* (288.6 °C²) (Emme and

Bennett, 2009; Noyola et al., 2015); debido a que estas especies habitan la zona inter-mareal, se espera que tengan una mayor adaptabilidad a las variaciones térmicas en comparación con *S. lalandi*, que habita en las zonas pelágica. En estas áreas marinas, el ambiente térmico es más estable que la zona inter-mareal, por esa razón, el jurel cola amarilla tendrá mecanismos limitados para enfrentar los cambios de temperatura como se ha reportado para *Centropomus undecimalis* (288.6 °C²) y *Ocyurus Chrysurus* (237.5 °C²) las cuales se clasifican como especies menos tolerantes a las fluctuaciones en la temperatura en comparación a especies que habitan las zonas con fluctuación térmica como arrecifes y manglares (Noyola et al., 2015).

Índices como el ARR nos dan un criterio de la importancia de la temperatura ambiental en donde viven especies como *S. lalandi*; en general se esperaba una respuesta de aclimatación lineal a través de los valores ARR debido a una aclimatación exitosa; aunque esto se observó en los valores de ARR obtenidos de TCM_{in}, se observó una respuesta inconsistente en los valores de ARR obtenidos a partir de los valores de TCM_{ax} en las temperaturas de 26 a 32 °C, esto sugiere un tiempo insuficiente para la aclimatación entre temperaturas de aclimatación o una respuesta fisiológica insuficiente para este rango de temperatura debido a que estas temperaturas se observan raramente en la zona pelágica donde se encuentra *S. lalandi*. Este hecho concuerda con lo expuesto por Carveth et al. (2006) quien menciona una posible susceptibilidad a temperaturas superiores a la temperatura final preferida de especies subtropicales y tropicales lo que señala la susceptibilidad fisiológica y metabólica de *S. lalandi* en temperaturas por arriba de 26 °C.

La relación entre la preferencia térmica, el óptimo metabólico y mayor capacidad respiratoria de los peces, se relacionan en el concepto de campo metabólico (Fry, 1947) a través del análisis del campo aeróbico metabólico y el campo aeróbico térmico. El alcance aeróbico más alto de los juveniles de *S. lalandi* se obtuvo en la temperatura de aclimatación de 26 °C mediante las metodologías Chase y TIRM; por lo tanto, la mayor cantidad de energía disponible para mantener los diferentes requerimientos fisiológicos y metabólicos se produce en esta temperatura. Estos resultados concuerdan con las temperaturas preferidas durante el día y la noche (25 °C), la preferencia térmica final (26 °C), el rango térmico donde se calculó el valores de 1 en el Q₁₀ (23-26 °C) y la temperatura donde ocurrió la mayor tasa de crecimiento (23 °C), lo que respalda eficazmente estos intervalos térmicos en los que se encontraron mejores condiciones metabólicas los juveniles. Por otro lado, el alcance aeróbico a temperaturas de 20 y 32 °C fue el más bajo, lo que significa que estas temperaturas ejercen una presión metabólica debido a la baja tasa metabólica o la necesidad de utilizar mecanismos alternativos para mantener la homeostasis (Nelson, 2016; Clark and Seymour, 2006) y por la insuficiente ingesta de oxígeno a altas temperaturas (Pötrner,

2010; Chabot et al., 2016; Rosewarne et al., 2016). Clark and Seymour (2006) mostraron que la velocidad de nado es muy importante para *S. lalandi* y que a 20 °C es necesaria una velocidad de natación de 1.2 BL s⁻¹ para mantener el metabolismo respiratorio mediante la ventilación opercular y ventilación RAM; debido a que en este estudio no se analizaron los efectos de la velocidad de nado, la velocidad de ventilación opercular y la capacidad de utilizar la ventilación con RAM, es posible que estas variables tengan inferencia en los resultados obtenidos. En la temperatura de 32 °C, se observó claramente que el rendimiento metabólico se vio afectado y después del incremento metabólico en Chase y TIRM las tasas metabólicas máximas no soportaron la demanda de energía, lo que resulta en el nivel de alcance aeróbico más bajo de acuerdo con el concepto de OCLTT.

Durante el segundo capítulo de la tesis se definieron dos condiciones experimentales: por un lado se determinó como temperatura óptima 26 °C, en esta temperatura se identificó una tasa metabólica idónea para mantener el metabolismo energético y a la vez, la mejor tasa de conversión alimenticia, por otro lado se determinó como temperatura sub-óptima 20 °C debido a que, aunque no se registró una disminución del consumo de oxígeno, ésta temperatura no fue preferida por los organismos juveniles de *S. lalandi* a pesa que en esta condición térmica se evaluaron altas tasas de crecimiento; esto generó la hipótesis de que en 20 °C se benefician el equilibrio energético y metabólico a pesar de la disminución del metabolismo respiratorio dependiendo en gran medida del aporte nutricional de la dieta.

Los resultados de crecimiento demostraron que en las dos temperaturas de aclimatación se obtuvieron porcentajes de crecimiento y tasa de conversión alimenticias máximos cuando se alimentaron los juveniles con la dieta de 14% de inclusión de lípidos. En 20 °C si identificaron los índices de crecimiento más altos con esta dieta sobre las dietas de 7 y 21% de inclusión de lípidos. Por un lado, la dieta de 7% de inclusión de lípidos no fue suficiente para mantener el crecimiento de los organismos juveniles, disminuyendo la tasa de crecimiento además de no generar reservas energéticas en el hígado, así mismo en esta condición se observó una menor excreción de amonio lo que indicó menor metabolismo de proteínas. La relación de los componentes de la dieta, sugiere que los elementos no nitrogenados en éste tratamiento influyeron significativamente en el crecimiento de los juveniles. Por otro lado la dieta de 21% de inclusión de lípidos permitió el máximo crecimiento en la temperatura de 26 °C lo que indica que es una temperatura adecuada para el desempeño enzimático destinado a la proteólisis lo que se evidencio con altos valores de excreción nitrogenada, al igual que un buen metabolismo de lípidos permitiendo mantener a los juveniles un buen estado energético he inclusive generar reservas energéticas en forma de gotas lipídicas en el hígado. La dieta de 21% de lípidos en 20 °C permitió una ganancia de peso mayor a la obtenida en con la dieta de 7% de lípidos, pero menor a la de 14% posiblemente se deba a un efecto retardado debido

a la disminución metabólica en esta temperatura evidenciada por la menor tasa metabólica postprandial de la dieta de 21% de lípidos en comparación de la de 14%, sin embargo, pese a esta ligera disminución de la tasa de crecimiento y menor tasa metabólica postprandial fue posible la generación de reservas energéticas en el hígado a través de gotas lipídicas.

Finalmente nuestros resultados indican que la microbiota intestinal se vio afectada significativamente por la temperatura ambiental donde la abundancia y la riqueza de las especies asociadas a las heces aumentaron significativamente en relación con el aumento de la temperatura del agua de 20 a 26 °C.

De acuerdo con nuestros resultados, la temperatura de 26 °C puede considerarse como la temperatura óptima no solo para el metabolismo de *S. lalandi* sino también para estimular el aumento en la riqueza y abundancia de la microbiota intestinal en correlación a la alimentación de los juveniles. Este hallazgo podría indicar la estrecha relación entre la temperatura ambiental y el ambiente que representa el sistema digestivo de los organismos ectotermos para la microbiota intestinal. Por otro lado, el ambiente frío tuvo un efecto significativo sobre la microbiota intestinal de *S. lalandi*, donde fue posible identificar una disminución significativa en la abundancia relativa y en la riqueza específica de la microbiota fecal principal. El hecho de que la abundancia de la microbiota intestinal cambia en relación con factores externos, como la temperatura, se ha observado en otros organismos poiquilotermos; Neuman et al. (2016) han demostrado que la temperatura ambiental influye más en las comunidades intestinales de los peces que en la dieta. Han demostrado que el número de diferentes grupos bacterianos entre dos dietas comerciales varió ligeramente mientras que el número de grupos bacterianos aumentó con el aumento de 10 °C en la temperatura del agua. Aunque no observaron diferencias significativas en la microbiota intestinal entre los peces alimentados con dos dietas comerciales, fue posible que las diferencias en la composición de la dieta no fueran suficientes para observar los cambios, ya que se observó a 26 °C durante este trabajo. Hovda et al. (2012) encontraron un perfil bacteriano consistente a lo largo del período de muestreo, observando el mayor número de bacterias en *Salmo salar* intestino a la temperatura más alta (18.8 °C). Kohl and Yahn, (2016) determinaron los efectos directos de la temperatura ambiental en la estructura de la comunidad microbiana intestinal de los renacuajos que exhibieron mayores abundancias a 28 °C en comparación con los 18 °C. Neuman et al. (2016) observaron que la microbiota del intestino grueso del salmón del Atlántico fluctuó como resultado de los cambios de temperatura estacionales (10.1 a 18.5 °C) mientras que con la dieta fluctuaron poco; Además, encontraron un cambio en el estado funcional de la microbiota intestinal.

En este trabajo, la temperatura de aclimatación de 20 °C podrían haber reducido diferentes procesos metabólicos de *S. lalandi* tales como: la demora de los procesos digestivos y el aumento del tiempo de tránsito intestinal los cuales podrían haber sido los principales factores que generaron esta disminución en la riqueza y abundancia de la microbiota fecal de *S. lalandi*; mientras que la temperatura de 26 °C pudo haber incrementado los procesos de degradación orgánica, proliferación de diferentes grupos bacterianos y aumento metabólico del huésped, lo que originó un mayor flujo de la microbiota intestinal observado en el aumento de los índices de diversidad alfa.

Se determinó un grupo microbiano compuesto por los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Propionibacterium* el cual se identificó en los diferentes tratamientos. Este grupo habían sido reportado como microbiota central de diferentes organismos acuáticos, como peces y moluscos por su importancia en la colonización del sistema de digestión de peces y como posibles indicadores de la calidad del agua en la agricultura sistema (Austin, 2006; Dehler et al., 2017; Guo et al., 2017). El género *Pseudomonas* ha sido identificado como un grupo de gran importancia en la colonización intestinal en estadios de larvas de peces y su permanencia en adultos. Además, el grupo dominante en los tratamientos a 26 °C fue *Achromobacter* del cual se ha identificado un gran número de los miembros de este grupo se atribuye a la retención de amonio en el sistema de cultivo, ya que estos microorganismos pueden desnitrificar nitratos y nitritos funcionalmente y convertirlos en dinitrógeno gaseoso (Guo et al., 2017). Los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter* se identificaron en los tratamientos con mayor inclusión de lípidos, que se han estudiado por su contribución enzimática durante los procesos de digestión de diferentes peces (Ray et al., 2012); podría indicar la importancia de estos dos géneros en la nutrición de *S. lalandi*.

En ambientes naturales, los organismos poiquiloterms, como los peces, están expuestos a fluctuaciones térmicas diarias o estacionales. Las diferentes respuestas mostradas por organismos como *S. lalandi* podrían haber sido determinadas por las variaciones térmicas que experimentaron en sus entornos naturales. En este caso, *S. lalandi* es una especie adaptada para vivir en ambientes naturales con un rango térmico de 15 °C a 28.3 °C durante todo el año. Sus diferentes procesos fisiológicos, como la nutrición, el desarrollo y el crecimiento, se ven afectados por la temperatura ambiental; Además, debido a que la microbiota intestinal se considera parte del sistema digestivo, esta se ve afectada de la misma manera que otros sistemas biológicos como el sistema circulatorio, el sistema respiratorio o el sistema digestivo.

Se han identificado pequeñas variaciones en la microbiota intestinal del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) durante el ciclo térmico anual. Aunque los autores no encontraron diferencias significativas usando el método de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE), identificaron variaciones en el

número de bacterias en el intestino a una temperatura de 18.8 a 5.5 °C (Hovda et al., 2012). Algunos autores han acordado que la microbiota intestinal está fuertemente asociada con el nivel trófico del hospedador, la salinidad del hábitat, la taxonomía y la filogenia; sin embargo, han concluido que los factores ecológicos y ambientales asociados con la biología del huésped podrían facilitar la selección de miembros microbianos específicamente en el tracto intestinal (Ley et al., 2008; Wong and Rawls, 2012). En este caso, debido a que *S. lalandi* es una especie pelágica la cual habita un ambiente térmico estable, probablemente haya influencias significativas en la microbiota intestinal debido a cambios anormales de temperatura; estas variables pueden tener un impacto negativo en la salud de los peces si existen otros factores estresantes, sin embargo, es necesario estudiar otros factores, como la tasa de cambio de la microbiota intestinal durante los cambios en la temperatura ambiental o si existe un cambio de presas respecto a la temperatura ambiental lo que pueda modificar si microbiota intestinal.

Todavía está en discusión si la temperatura ambiental influye directa o indirectamente en la composición de la comunidad microbiana de organismos poiquiloterms; sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo, pudimos identificar la influencia de dos temperaturas de aclimatación sobre la abundancia relativa y la riqueza específica de la microbiota fecal de *S. lalandi*. Nuestros resultados determinaron la estabilidad en la microbiota intestinal a temperaturas de crecimiento óptimas para el huésped y se detectaron cambios significativos a la temperatura de 20 °C.

Capítulo 5. Conclusiones

A través del análisis de las diferentes respuestas estudiadas en este trabajo, se demostró que los juveniles de *Seriola lalandi* exhiben el mejor desempeño fisiológico y metabólico en el rango de temperaturas de 23 a 26 °C.

S. lalandi presentó una tolerancia térmica característica de los peces subtropicales con un área de la ventana térmica fue de 258 °C² el cual corresponde a especies con una tolerancia térmica menor que especies euritérmicas.

A través del método de Chase se evidencio la respuesta respiratoria y muscular de los juveniles de la especie *S. lalandi* observando el máximo alcance aeróbico en 26 °C, estas respuestas permitieron caracterizar a la especie como un organismo atlético.

A través del método de TIRM se demostró que *S. lalandi* tiene una respuesta metabólica restringida al aumento de la temperatura debido a las limitaciones de los organismos atléticos tales como la dependencia del desplazamiento para mantener su temperatura corporal y mantener su mecanismo de ventilación.

Las temperaturas de aclimatación de 20 y 26 °C no generan un efecto negativo en la nutrición y crecimiento de los juveniles de *S. lalandi*.

El metabolismo de proteínas de los juveniles de *S. lalandi* se ve favorecido en la temperatura de 26 °C en comparación a 20 °C, mientras que el metabolismo de lípidos de los juveniles de *S. lalandi* se ve favorecido en la temperatura de 20 °C en comparación a 26 °C.

En la temperatura de 26 °C se requiere un porcentaje de inclusión de lípidos mínimo de 14% con el cual es posible mantener un crecimiento y salud adecuado de los juveniles de *S. lalandi*.

La temperatura ambiental de 20 °C y una dieta deficiente afectaron la nutrición y la comunidad microbiana asociada al sistema digestivo de *Seriola lalandi* induciendo una menor tasa de crecimiento, y menores índices de diversidad α de la microbiota intestinal.

Los efectos negativos en el crecimiento y en el equilibrio en la microbiota intestinal de los juveniles de *Seriola lalandi* bajo temperaturas de 20 °C pueden ser minimizados si se incrementa el porcentaje de lípidos en la dieta a partir de 21%, lo cual propicia una mayor ganancia en peso y mayor riqueza y diversidad de especies en la microbiota intestinal.

Literatura citada

- Abbink, Wout, Blanco-Garcia, Ainhoa, Roques, Jonathan A. C., Partridge, Gavin J., Kloet, Kees, Schneider, Oliver., (2012). The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi* in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*. 330-333, 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.043>.
- Abdo de la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, L.E., Hernández, C., Hernández, K., González- Rodríguez, B., Martínez-Rodríguez, I., García-Ortega, A., (2010). Effect of different levels of protein and total lipids in the diet on the growth and survival of juvenile spotted red snapper *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45 (3), 433–439.
- Aguilera, E., Yany G. and Romero J., (2013). Cultivable intestinal microbiota of yellowtail juveniles (*Seriola lalandi*) in an aquaculture system. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 41 (3), 395-403.
- Austin B., Stuckey L. F., Robertson P. A. W., Effendi I., Griffith D. R. W. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*. Volume 18, Issue 1. 93-96 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb01271.x>
- Austin, B. (2006). The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *The Scientific World JOURNAL*, 6, 931–945. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.181>.
- Avilés, A. Q., Castelló, O. F., (2004). *Manual para el Cultivo de Jurel*. INAPESCA.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Muzquiz, J.L., (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114, 173–186.
- Brett J.R. and Groves T.D.D., (1979). Physiological energetics. In: *Fish Physiology*. Vol VIII: Bioenergetics and Growth (ed. by W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett), pp. 279-352. Academic Press, New York, USA.
- Booth, Mark A., Allan, Geoff L., Pirozzi, I. (2010). Estimation of digestible protein and energy requirements of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* using a factorial approach. *Aquaculture*. 307 (3-4), 247-259.
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., Stone, D. A.J. (2012). Replacement of fish oil by poultry oil and canola oil in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal and suboptimal temperatures. *Aquaculture*. 356-357, 211-222.
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., Adams, L. R., Thomson, M. J.S., Stone, D. A. J. (2013). The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) feeds at different water temperatures: 2. Soy protein concentrate. *Aquaculture*. 1-10
- Burr G., Gatlin D. III., Ricke S., (2007). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract of Fish and the Potential Application of Prebiotics and Probiotics in Finfish Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol 36 (4). <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00390.x>
- Carveth, C. J., Widmer, A. M., Bonar, S. A., (2006). Comparison of Upper Thermal Tolerances of Native and Nonnative Fish Species in Arizona. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135(6), 1433–1440. <https://doi.org/10.1577/T05-025.1>

- Casterlin, M. E., and Reynolds, W. W., (1980). Thermoregulatory Behavior of a Tropical Marine Fish *Canthigaster jactator* (Jenkins). *Hydrobiologia*, 70 (3), 269–270. <https://doi.org/10.1007/bf00016770>
- Chabot, D., Steffensen, J. F., Farrell, A. P., (2016). The determination of standard metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology*, 88 (1), 81-121. <https://doi.org/10.1111/jfb.12845>
- Clarke, A. and Johnston, N. M., (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology* 68, 893–905.
- Clark, T. D., Sandblom, E., and Jutfelt, F. (2013). Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. *Journal of Experimental Biology*, 216(15), 2771–2782. <https://doi.org/10.1242/jeb.084251>
- Clark, T. D., and Seymour, R. S., (2006). Cardiorespiratory physiology and swimming energetics of a high-energy-demand teleost, the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *The Journal of Experimental Biology*, 209, 3940-3951. <https://doi.org/10.1242/jeb.02440>.
- Claussen D. L., (1977). Thermal Acclimation in Ambystomatid Salamanders. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol 58 A. 33-340.
- Das, T., Pal, A. K., Chakraborty, S. K., Manush, S. M., Sahu, N. P., Mukherjee, S. C., (2005). Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 30(5), 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2005.03.001>
- Deacon J. E., Schumann, P. B and Stuenkel E. L., (1987). Thermal tolerances and preferences of fishes of the virginriver system (Utah, Arizona, Nevada). *The Great Basin Naturalist*, 47(4), 538–546.
- Denev S, Staykov Y, Moutafchieva R, Beev G., (2009). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research*. 1 (4), 1-29. [10.1111/j.1749-7345.2005.tb00390](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00390).
- Dehler, C. E., Secombes, C. J., and Martin, S. A. M., (2017). Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 467, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.017>.
- Díaz, F., Re, A. D., González, R. A., Sánchez, L. N., Leyva, G., and Valenzuela, F., (2007). Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) acclimated to different temperatures. *Aquaculture Research*, 38(13), 1387–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01817>.
- Díaz, F., Sierra, E., Re, a. D., Rodriguez, L., (2002). Behavioural thermoregulation and critical thermal limits of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegman). *Journal of Thermal Biology*, 27, 423–428. <https://doi.org/10.1016/S0306-4565>.
- Dowd, W. W., Brill, R. W., Bushnell, P. G., Musick, J. A., (2006). Standard and routine metabolic rates of juvenile sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*), including the effects of body mass and acute temperature change, *Fishery Bulletin*, (2720), 323–331.
- Emme, J., and Bennett, W. a., (2009). Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from

- Sulawesi, Indonesia. *Journal of Thermal Biology*, 34(5), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.02.005>
- Enders, E. C., and Boisclair, D., (2016). Effects of environmental fluctuations on fish metabolism: Atlantic salmon *Salmo salar* as a case study. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 344–358. <https://doi.org/10.1111/jfb.12786>
- Escalante A. E., (2007). La ecología molecular en el estudio de las comunidades bacterianas. *Ecología molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. 393-425.
- Flores, M., Díaz, F., Medina, R., Re, A.D., Licea, A., (2008). The effect of dietary astaxanthin on physiological responses of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* acclimated to low-salinity water. *Journal of Fisheries International* 3(3), 75-82.
- Fry F.E.J., (1947). Effects of the environment on animal activity. University of Toronto Studies Biology Series 55, *Publication of the Ontario Fisheries Research Laboratory*, 68, pp.1-62.
- Gómez G. D. and Balcázar J. L., (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 52 (2), 145-154. 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x.
- Gómez-Gil B., Roque A., Turnbull J. F., (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. Volume 191, Issues 1–3, 20 November 2000, Pages 259-270. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00431-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00431-2)
- Guo, Y., Pan, Q., Yan, S., and Chen, Y., (2017). *Bdellovibrio* and like organisms promoted growth and survival of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino and modulated bacterial community structures in its gut. *Aquacult Int*. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0138-x>.
- Hernández, C., Osuna-Osuna, Lo., Benítez-Hernández, A., Sánchez, Y., (2014). Replacement of fish meal by poultry by-product meal, food grade, in diets for juvenile spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 42 (1), 1-10.
- Hill GT, Mitkowski NA, Aldrich-Wolfe L, Emele LR, Jurkonie DD, Ficke A, Maldonado-Ramirez S, Lynch ST, Nelson EB., (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.* 15: 25–36.
- Hovda, M. B., Fontanillas, R., Mcgurk, C., Obach, A., and Rosnes, J. T., (2012). Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 43(1), 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02805.x>.
- Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A., and Sogin, M. L. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255>.
- Hutson, K. S., Ingo E., Mooney, A.J., Whittington, I. D. (2007). Metazoan parasite assemblages of wild *Seriola lalandi* (Carangidae) from eastern and southern Australia. *Parasitology International*. 56, 95-105.
- Ihnat, J. M., and Bulkley, R. V., (1984). Influence of acclimation temperature and season on acute temperature preference of adult mountain whitefish, *Prosopium williamsoni*. *Environmental Biology of Fishes*, 11(1), 29–40. <https://doi.org/10.1007/BF00001843>

- Irianto A. and Austin B., (2002). Review Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. 633-642.
- Jobling, M., (1981). Temperature tolerance and the final preferendum-rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *J. Fish Biol.*, 19, 439–455.
- Johnston, I. A. and Dunn, J. F. (1987). Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *In Temperature and Animal Cell (Ed. K. Bowler and B. J. Fuller)*. Cambridge: *Symposia of the Society for Experimental Biology XXXI*.
- Kellogg, R. L., and Gift, J. J., (1983). Relationship between Optimum Temperatures for Growth and Preferred Temperatures for the Young of Four Fish Species. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(3), 424–430. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1983\)112<424](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1983)112<424)
- Kohl, K. D., and Yahn, J., (2016). Effects of environmental temperature on the gut microbial communities of tadpoles. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1561–1565. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13255>.
- Lee, C. G., (2003). Excess post-exercise oxygen consumption in adult sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon following critical speed swimming. *Journal of Experimental Biology*, 206(18), 3253–3260. <https://doi.org/10.1242/jeb.00548>.
- Lessard J. L., and Hayes D., (2003). Effects of elevated water temperature on fish and macroinvertebrate communities below small dams. *River Research and Applications*. 19 (7), 721-732.
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., and Gordon, J. I., (2008). Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 776–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1978>.
- Lin, B., Wang, Z., Malanoski, A. P., O'Grady, E. A., Wimpee, C. F., Vuddhakul, V., et al. (2010). Comparative genomic analyses identify the *Vibrio harveyi* genome sequenced strains BAA-1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 81–89. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00100.x
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H., Vinagre, C., (2012). Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. *Journal of Sea Research*, 70, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.03.002>
- Majhi, S. K., Das, S. K., Rajkhowa, D., (2013). Effects of elevated water temperature on tolerance and stress in chocolate mahseer *Neolissochilus hexagonolepis*: Implications for habitat restoration and conservation. *Current Science*, 105(3), 379–382. <https://doi.org/10.1029/2008JB005644.10>.
- Martin, M., (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high throughput sequencing reads. *EMBnet journal Bioinformatic in Action*. Vol 17 (1). <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- McMahon T. E., Bear E. A., and Zale A. V., (2008). Use of an Annular Chamber for Testing Thermal Preference of Westslope Cutthroat Trout and Rainbow Trout. *Journal of Freshwater Ecology*, 23(1), 55–63.
- Medland T.E, and Beamish F.W.H. (1985). The influence of diet and fish density on apparent increment in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 47:1–10.
- Miegel, R. P., Pain, S. J., Wettter, W. H. E. J. Van, Howarth, G. S., Stone, D. A. J., (2010). Effect of water temperature on gut transit time, digestive enzyme activity and nutrient digestibility in yellowtail king fish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 308 (3–4), 145–151.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.036>

- Mora, C., and Maya, M., (2006). Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. *Journal of Thermal Biology*, 31 (4), 337-341.
- Mora C. and Ospína A., (2001). Tolerance to high temperatures and potential impact of sea warming on reef fishes of Gorgona Island (tropical eastern Pacific). *Marine Biology*. 139: 765±769 DOI 10.1007/s002270100626
- Morice, C. P., Kennedy, J. J., Rayner, N. A., Jones, P. D., (2012). Quantifying uncertainties in global and regional temperature change using an ensemble of observational estimates: The HadCRUT4 data set. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 117(8), 1–22. <https://doi.org/10.1029/2011JD017187>
- Nakada, M., (2000). Yellowtail and related species culture. In: Stickney, R.R. (Ed.), *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley and Sons, New York, pp. 1007–1036.
- Navarrete, P., Espejo, R.T. and Romero, J., (2009). Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microb. Ecol.*, 57, 550–561.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Reserch*. Vol 41 (11) <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Nelson, J., (2016). Oxygen consumption rate v. rate of energy utilization of fishes: A comparison and brief history of the two measurements. *Journal of Fish Biology*, 88 (1), 10-25. <https://doi.org/10.1111/jfb.12824>
- Neuman, C., Hatje, E., Zarkasi, K. Z., Smullen, R., Bowman, J. P., and Katouli, M., (2016). The effect of diet and environmental temperature on the faecal microbiota of farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 47(2), 660–672. <https://doi.org/10.1111/are.12522>
- Norin, T., Malte, H., Clark, T D., (2014). Aerobic scope does not predict the performance of a tropical eurythermal fish at elevated temperatures. *The Journal of Experimental Biology*. 217, 244-251 [doi:10.1242/jeb.089755](https://doi.org/10.1242/jeb.089755).
- Noyola R., J., Mascaro, M., Díaz, F., Denisse Re, A., Sánchez-Zamora, A., Caamal-Monsreal, C., Rosas, C., (2015). Thermal biology of prey (*Melongena corona bispinosa*, *Strombus pugilis*, *Callinectes similis*, *Libinia dubia*) and predators (*Ocyurus chrysurus*, *Centropomus undecimalis*) of *Octopus maya* from the Yucatan Peninsula. *Journal of Thermal Biology*, 53, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.11.001>.
- Paschke K, Agüero J, Gebauer P, Díaz F, Mascaró M, López-Ripoll E, Re A. D., Caamal-Monsreal C, Tremblay N, Portner H. O., Rosas C. (2018). Comparison of aerobic scope for metabolic activity in aquatic ectotherms with temperature related metabolic stimulation: a novel approach for aerobic power budget. *Frontiers in Physiology*.
- Pérez, T., Balcázar, J., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., and JL., M. (2010). Host – microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology*. 3 (4), 355–360. <https://doi.org/doi:10.1038/mi.2010.12>
- Pirozzi, I., and Booth, M. A. (2009). The routine metabolic rate of mulloway (*Argyrosomus japonicus*: Sclaienidae) and yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*: Carangidae) acclimated to six different

- temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 152(4), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.01.008>
- Pörtner, H. O., (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*. 88, 137-146.
- Pörtner, H.-O., (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 881–893. <https://doi.org/10.1242/jeb.037523>
- Ray, A. K., Ghosh, K., and Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465–492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>
- Radonic, M., Müller, M I., López, A V., Bambill, G A., Spinedi, M., Boccanfuso, J J. (2007). Avances en la reproducción controlada del lenguado *Paralichthys orbignyanus* en Argentina Improvement in flounder *Paralichthys orbignyanus* controlled spawning in Argentina. *Ciencias Marinas* (2007), 33(2): 187–196
- Re, A. D., Díaz, F., Sierra, E., Gómez-Jiménez, S., (2004). Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora de *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) expuesto a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad. *Ciencias Marinas*, 30 (3), 443–453.
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-valle, F., Civera-Cerecedo, R., (2011). Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonashydrophila*. *Aquaculture Research*, 2011, 42, 1676^1686 doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02762.x
- Reynolds, W. W., Casterlin, M. E., (1979). Thermoregulatory behavior of brown trout, *Salmo trutta*. *Hydrobiologia*, 62(1), 79–80. <https://doi.org/10.1007/BF00012567>
- Ringo, E., Strom, E. and Tabachek, J.-A., (1995). Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquacult. Res.* 26, 773–789.
- Ringo E, Lovmo L, Kristiansen M, Bakken Y, Salinas I, Myklebust R, Olsen RE and Mayhew TM. (2010). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research* 41: 451-467.
- Roche, D. G., Taylor, M. K., Binning, S. A., Johansen, J. L., Domenici, P. and Steffensen, J. F., (2014). Unsteady flow affects swimming energetics in a labriform fish (*Cymato- gaster aggregata*). *Journal of Experimental Biology*. 217, 414–422. doi: 10.1242/ jeb.085811
- Rodríguez F. R., Lazareno M., M., Espinosa C., L. D., Basto Rosales, M. E. R., Vega Villasante, F., (2012). Temperatura óptima y preferencia térmica del camarón de río *Macrobrachium tenellum* en la costa tropical del Pacífico Mexicano. *Boletim Do Instituto de Pesca*, 38 (2), 121–130.
- Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, Rawls JF., (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J*. 5(10):1595-608. doi: 10.1038/ismej.2011.38.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F., (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4(e2584). <https://doi.org/DOI 10.7717/peerj.2584>.
- Rosas C., A. Sánchez, M.E. Chimal, R. Brito., (2003). Manual de métodos para la evaluación del balance

energético en crustáceos. Jornadas iberoamericanas de nutrición acuícola. Avances de la Nutrición de Camarones Peneidos: Hacia la Optimización de Alimentos y Estrategias de Alimentación para una Camaronicultura Sustentable Centro de Formación de la Cooperación Española en Cartagena de Indias, Colombia, 7 a 11 de julio de 2003.

- Rosas, C., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Chay, D., López, N., Maldonado, T., Domingues, P.M., (2007). Energy balance of Octopus maya fed crab and artificial diet. *Mar. Biol.* 152, 371–381.
- Rosewarne, P. J., Wilson, J. M., Svendsen, J. C., (2016). Measuring maximum and standard metabolic rates using intermittent-flow respirometry: A student laboratory investigation of aerobic metabolic scope and environmental hypoxia in aquatic breathers. *Journal of Fish Biology.* 88(1), 265-283. <https://doi.org/10.1111/jfb.12795>
- Schmidt-Nielsen K., 1997. *Animal Physiology: Adaptation and Environment.* Cambridge University Press, UK.
- Schram, E., Bierman, S., Teal, L. R., Haenen, O., van de Vis, H., Rijnsdorp, A. D., (2013). Thermal Preference of Juvenile Dover Sole (*Solea solea*) in Relation to Thermal Acclimation and Optimal Growth Temperature. *PLoS ONE*, 8(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061357>
- Schulte, P. M., (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1856–1866. <https://doi.org/10.1242/jeb.118851>
- Secor, S. M. (2009). Specific dynamic action: A review of the postprandial metabolic response. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 179(1), 1–56. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0283-7>.
- Semova, I., Carten, J. D., Stombaugh, J., MacKey, L. C., Knight, R., Farber, S. A., and Rawls, J. F., (2012). Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host and Microbe*, 12(3), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.003>.
- Silva-Carrillo Y, Hernández C, Hardy RW, González-Rodríguez B, Castillo-Vargasmachuca S., (2012). The effect of substituting fish meal with SBM on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture* 364–365:180–185.
- Stenseth, N.C., Mysterud, A., Ottersen, G., Hurrell, J. W., Chan, K.S. and Lima, M., (2002). Ecological effects of climate fluctuations. *Science* 297, 1292–1296.
- Taoka Y, Maeda H, Jo J Y, Jeon MJ, Bai SC, Lee WJ, Yuge K, Koshio S., (2006). Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Sci* 72 (2): 310-321
- Tirsgaard, B., Svendsen, J. C., and Steffensen, J. F. (2015). Effects of temperature on specific dynamic action in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(1), 41–50. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-0004-y>
- Toranzo, A. E., Magariños, B., R., Jesús L., (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*. 246, 37–61

- Valdebenito, I., Fletcher, C., Vera, V., Fernández, J., (2009). Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revision Physical-chemical factors that regulate spermatic motility in fish: basic and applied aspects. A review. *Arch Med Vet.* 41, 97-106
- Vázquez, J. A., M. P. Gonthlez, and M. A. Murado., (2005). Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture.* 245: 149-161.
- Vendrell D, Balcazar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Girones O and Muzquiz JL., (2007). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (in press).
- Wang, A. R., Ran, C., Ringo, E., and Zhou, Z. G. (2017). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture, 0*, 1–15. <https://doi.org/doi:10.1111/raq.12191>
- Wesley W. D., Brill R. W., Bushnell P. G., Musick J. A., (2006). Standard and routine metabolic rates of juvenile sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*), including the effects of body mass and acute temperature change. *Fish. Bull.* 104:323–331.
- Whiteley A.S. Jenkins S., Waite I., Kresoje N., Payne H., Mullan B., Allcock R., and O'Donnell A., (2012). Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *Journal of Microbiological Methods.* Volume 91, Issue 1, Pages 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.07.008>
- Wong, S., and Rawls, J. F., (2012). Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. *Molecular Ecology,* 21(13), 3100–3102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05646.x>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R., (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology,* 12, 635–645. <https://doi.org/doi:10.1038/nrmicro3330>
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., and Chun, J., (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 67, 1613–1617. <https://doi.org/DOI10.1099/ijsem.0.001755>
- Zhang M, Sun Y, Chen K, Yu N, Zhou Z, Chen L, Du Z, Li E. (2014). Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture,* 434: 449-455.
- Zheng, Z., Jin, J.C., Mingyun, L., Peifeng, B., Shuanglin, D., (2008). Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile miiuy croaker, *Miichtys miiuy* (Basilewsky). *Aquaculture* 16,581-589.