

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



---

**Maestría en Ciencias en Acuicultura**

---

**Efecto de la inclusión de GroBiotic®-A en dietas bajas en harina de  
pescado sobre el desempeño biológico, digestión, salud y microbiota  
intestinal de *Seriola dorsalis***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Adriana Jeanette Ramirez Sosa**

Ensenada, Baja California, México  
2020

Tesis defendida por  
**Adriana Jeanette Ramirez Sosa**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Juan Pablo Lazo Corvera**  
Director de tesis

Miembros del comité

**Dr. Benjamín Barón Sevilla**

**Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier**

**Dr. José Antonio Mata Sotres**



---

**Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz**  
Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Adriana Jeanette Ramírez Sosa** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Efecto de la inclusión de GroBiotic®-A en dietas bajas en harina de pescado sobre el desempeño biológico, digestión, salud y microbiota intestinal de *Seriola dorsalis***

Resumen aprobado por:

---

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera  
**Director de tesis**

Los peces carnívoros de cultivo requieren grandes porciones de proteína en las dietas y la harina de pescado (HP), ha sido la principal fuente por muchos años. Sin embargo, debido a los decrementos en la producción de la HP, al incremento en la demanda y a sus elevados precios, se han estado buscando fuentes proteicas alternativas que permitan cumplir con los requerimientos nutricionales de los organismos de cultivo. Asimismo, la inclusión de compuestos funcionales, como los prebióticos, en dietas ricas en proteína vegetal como la harina de soya (HS), pueden favorecer su digestibilidad, así como el crecimiento y salud de los individuos. Por otro lado, el jurel (*Seriola dorsalis*) es una especie de gran importancia económica y recientemente en México se comenzó a cultivar a escala comercial, sin embargo, la información sobre la inclusión de compuestos funcionales en dietas elaboradas con fuentes alternativas a la HP, es escasa. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto del prebiótico comercial Grobiotic®-A (GBA) en 3 niveles de inclusión en una dieta con un contenido alto de HS, para determinar los efectos en el desempeño biológico, digestión, salud intestinal (la interleucina 1- beta (IL-1 $\beta$ ), la proteína de choque térmico 70 (HSP70), la maltasa-glucoamilasa (*mga*) y la aminopeptidasa N (*apn*)) y composición del microbioma intestinal por medio de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) en juveniles del jurel. Se formularon cuatro dietas isoproteicas (48% PC) e isolipídicas (15% LC) con 64% de HS y con niveles de inclusión de GBA al 0, 1, 2 y 3%, que fueron asignadas aleatoriamente y evaluadas por triplicado en un sistema de recirculación de agua de mar compuesto por 12 tanques. Los peces fueron alimentados por 42 días a saciedad aparente, tres veces al día. Al finalizar el bioensayo, se observó que GBA no tiene efectos significativos en los parámetros de eficiencia alimenticia, crecimiento y composición proximal. Mientras que en la actividad enzimática solo se presentaron efectos significativos en la actividad de las lipasas del intestino y amilasas del intestino y ciegos pilóricos. La digestibilidad de las dietas con inclusión del 2 y 3% de GBA se incrementó significativamente en comparación con la dieta con el 1% GBA. En la expresión relativa de los genes relacionados con la salud intestinal, hubo una expresión significativa de la *il-1 $\beta$*  en el tratamiento con el 2% de GBA, asimismo para la *apn* en el tratamiento con el 3% GBA. Sin embargo, para la *hsp70* y *mga*, no se detectaron efectos significativos. Por último, en el análisis de DGGE se observó que los peces alimentados con el 2 y 3% de GBA presentaron una composición microbiana similar entre ellos, mientras que con el 1% de GBA y el control, no fueron similares entre sí. De acuerdo a estos resultados, se concluye que la inclusión del 2% de GBA en las dietas con alto contenido de harina de soya, es una buena alternativa para disminuir el consumo de la harina de pescado en la alimentación del *S. dorsalis*. No obstante, se sugiere realizar un análisis más amplio en cuanto al microbioma y la morfología del intestinal usando HS de diferentes calidades para determinar de manera mas específica el efecto del GBA en dietas con alto contenido de HS en el cultivo del *S. dorsalis*.

**Palabras clave:** Ingredientes alternativos, compuestos funcionales, prebiótico, Grobiotic®-A, desempeño biológico, actividad enzimática, digestibilidad, salud intestinal, microbiota intestinal, *Seriola dorsalis*.

Abstract of the thesis presented by **Adriana Jeanette Ramirez Sosa** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Effect of the inclusion of GroBiotic®-A in low fishmeal diets on the biological performance, digestion, health and intestinal microbiota of *Seriola dorsalis***

Abstract approved by:

---

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera  
Thesis Director

Carnivorous fish require large amounts of protein in their diets and fishmeal (FM) has been used for many years to meet this demand. However, due to increase fishing pressure, fluctuating FM production and higher demand from aquaculture, has led to high prices of this protein source and concerns of the future sustainability of the industry. The latter has led to the search for alternative protein sources to meet the high protein demand and nutritional requirements of the marine fish. In this respect, the inclusion of functional compounds, as prebiotics, in diets with high content of alternative vegetal proteins like the soybean meal (SBM), increases growth, digestibility and health of the fish. The California Yellowtail (*Seriola dorsalis*) is a species with great economic importance in North America and Mexico recently began the commercial scale culture of this species. Nonetheless, little information has been published to date evaluating the inclusion of functional compounds in diets based in alternatives sources to FM. Therefore, the objective of this study was to evaluate the inclusion of a commercial prebiotic, Grobiotic®-A, at 3 levels of inclusion in diets with high SBM content, to determine the effects in growth performance, digestion, intestinal health (interleucine 1- beta (IL-1 $\beta$ ), heat-shock protein 70 (HSP70), maltase-glucoamylase (*mga*) and aminopeptidase N (*apn*)) and intestinal microbiome composition using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in California Yellowtail juveniles. Four isoproteic (48% CP) and isolipidic (15% CL) diets based on 64% SBM and different inclusion levels of GBA (0, 1, 2 and 3%) were formulated. The diets were randomly assigned and evaluated in triplicate in a seawater recirculating system composed of 12 tanks. The fish were fed to apparent satiation three times a day for a period of 42 days. At the end of the experiment no significant effects of GBA dietary inclusion were found in terms of growth, feed efficiency and fish proximate composition. Significant effects were found on the specific activity of lipase in the intestinal region and amylase of the intestinal and pyloric regions. *In vitro* protein digestibility of diets with 2 and 3% of GBA significantly increased compared to the 1% GBA diet. The relative expression of genes related to intestinal health, was a significantly increased for *il-1 $\beta$*  in the 2% GBA treatment, and for the *apn* in the 3% GBA treatment. Nonetheless, *hsp70* and *mga* expression were not significantly affected by dietary treatment. Finally, using the DGGE analysis fish fed the 2 and 3% GBA treatments resulted in similar microbial composition, while the 1% GBA treatment and the control, were not similar between each other. Based on the results from the present study, the inclusion of 2% GBA in diets with high soybean meal inclusion levels is a good alternative to decrease the use of fishmeal in the feeding of *S. dorsalis*. However, more in-depth analysis of gut microbiome and intestinal morphology with lower quality SBM is required to continue assessing the potential beneficial effects of GBA in the culture of *S. dorsalis*.

**Keywords:** Alternative ingredients, functional compounds, prebiotic, Grobiotic®-A, growth performance, enzyme activity, digestibility, intestinal health, gut microbiota, *Seriola dorsalis*.

## **Dedicatoria**

**A mi madre, que aunque no pudiste verme concluir esta meta en mi vida, sé que donde estás te encuentras muy orgullosa de mi. Gracias por siempre apoyarme y alentarme a ser mejor. Te amo y extraño.**

**D.E.P**

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por haberme aceptado en el programa de Maestría y permitirme concluir mi trabajo de tesis.

A la empresa Baja Ocean Labs por los juveniles de jurel donados para la realización del presente estudio.

Al Dr. Juan Pablo Lazo por aceptarme como su estudiante, por sus consejos, enseñanzas y paciencia. Gracias por la confianza y motivación que me impulsó a esforzarme más como estudiante y a conocer esta parte de mi que no tenía presente en mi vida.

A mi comité de tesis, al Dr. Benjamín Barón, Dr. Pierrick Fournier y Dr. José Mata, por sus cuestionamientos y consejos que me ayudaron a mejorar mi trabajo de tesis.

A la Dra. Viana y su personal de laboratorio por el apoyo y su valiosa contribución en este proyecto.

Al Dr. Gatlin, por aceptar y brindarme el apoyo en una gran parte de este trabajo, el cual me permitió enriquecer de información mi proyecto de tesis.

Al Dr. Mario Galaviz y técnicos de laboratorio Dr. Fernando Barreto y Samantha Victoria por contribuir con el préstamo de equipo de laboratorio.

A la Dra. Mónica Hernández y Dra. Beatriz Cordero por facilitarme el material y equipo de laboratorio para la realización de las pruebas experimentales. Asimismo, a la estudiante de doctorado Candy Armuelles por acompañarme y enseñarme las técnicas y trucos para el cultivo y análisis de jurel.

Al personal técnico del Departamento de acuicultura, en especial al técnico del laboratorio de Nutrición, Abelardo Campos, por la ayuda brindada en las biometrías, muestreos y trabajo de laboratorio. Así como los consejos y momentos de risa. También al técnico Luis Murillo por sus consejos y apoyo en el sistema de cultivo.

Al personal administrativo, Dalila, Bibiana y Cecy por facilitar y apoyar en cada uno de los tramites durante el curso de la maestría.

A los investigadores del Departamento de Acuicultura que fueron mis guías en mi primer año de maestría: Dr. Jorge Cázares, Dra. Ma. Refugio González, Dra. Carmen Paniagua, Dra. Mónica Hernández, Dra. Beatriz Cordero, Dr. Miguel del Rio, Dr. Benjamín Barón y Dr. Juan Pablo Lazo.

A mis compañeros de laboratorio, Eliasid y Jazmine por ayudarme con su experiencia en el cultivo y análisis de muestras de mis peces. También por los momentos de estrés y desestrés.

A mis compañeros y amigos de generación, Jazmine, Itzel, Jeaneth, Sandra y Atondo, por todos los momentos compartidos, consejos y ayuda dentro y fuera de la maestría.

A mis padres y hermanas por motivarme a ser mejor persona y cumplir con mis metas. Muchas gracias por tratar de entenderme en mis rollos científicos. Los amo.

A mis amigas de toda la vida, Andrea y Caro y a mis amigos biólogos, Cons, Teresa, Juan, Alfred y Marylu, por estar conmigo en todo momento y echarme porras.

A Jorge por apoyarme y estar conmigo en los momentos más difíciles durante este proceso. Gracias por inspirarme y motivarme.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español .....	i
Resumen en inglés .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Lista de figuras .....	ix
Lista de tablas .....	x

### Capítulo 1. Introducción

1.1 Estado actual de la harina de pescado en la acuicultura .....	1
1.2 Fuentes alternativas a la harina de pescado .....	1
1.2.1 Harina de soya y sus efectos .....	2
1.3 Compuestos funcionales en la nutrición de peces .....	3
1.4 Antecedentes.....	4
1.4.1 Prebióticos .....	4
1.4.1.1 Efecto de los prebióticos en la salud intestinal de los peces de cultivo .....	5
1.4.2 Grobionic®-A .....	7
1.4.3 <i>Seriola dorsalis</i> .....	7
1.5 Justificación .....	9
1.6 Hipótesis.....	10
1.7 Objetivos .....	10
1.7.1 Objetivo general .....	10
1.7.2 Objetivos específicos .....	11

### Capítulo 2. Metodología

2.1 Formulación y elaboración de dietas .....	12
2.2 Animales, condiciones de cultivo y diseño experimental .....	12
2.3 Muestreo .....	14
2.4 Parámetros del desempeño biológico .....	15
2.4.1 Ganancia de peso .....	15
2.4.2 Coeficiente térmico de crecimiento (CTC) .....	15
2.4.3 Tasa de crecimiento específica (TCE).....	15
2.4.4 Índices somáticos .....	16

2.4.5 Factor de condición (FC) .....	16
2.5 Eficiencia alimenticia.....	16
2.5.1 Tasa de conversión alimenticia (TCA) .....	16
2.5.2 Tasa de eficiencia proteica (TEP) .....	17
2.5.3 Valor productivo de la proteína (VPP) .....	17
2.6 Supervivencia.....	17
2.7 Análisis de composición proximal.....	18
2.8 Actividad de las enzimas digestivas .....	18
2.8.1 Tripsina.....	19
2.8.2 Leucina aminopeptidasa .....	19
2.8.3 Lipasa .....	19
2.8.4 Amilasa.....	20
2.8.5 Actividad total y específica.....	20
2.9 Digestibilidad in vitro .....	21
2.9.1 Actividad proteolítica alcalina de los extractos enzimáticos de intestino .....	21
2.9.2 Hidrólisis de las dietas utilizando la técnica de pH-stat.....	22
2.10 Expresión de genes relacionados con la salud intestinal .....	23
2.10.1 Extracción de RNA y RT-qPCR.....	23
2.11 Perfil de microbiota intestinal .....	24
2.11.1 Extracción de DNA y PCR.....	24
2.11.2 Análisis de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).....	25
2.12 Análisis estadístico .....	26
<b>Capítulo 3. Resultados</b>	
3.1 Parámetros de desempeño biológico y eficiencia alimenticia .....	27
3.2 Composición proximal de cuerpo completo .....	28
3.3 Actividad de las enzimas digestivas .....	28
3.4 Digestibilidad in vitro .....	30
3.5 Análisis de genes relacionados con la salud intestinal.....	31
3.6 Análisis de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).....	32
<b>Capítulo 4. Discusión</b> .....	34
<b>Capítulo 5. Conclusiones</b> .....	43

**Capítulo 6. Recomendaciones..... 44**

**Literatura citada ..... 45**

## Lista de figuras

Figura	Página
1	Jurel cola amarilla de California ( <i>Seriola dorsalis</i> Gill 1863) ..... 8
2	Digestibilidad (% grado de hidrólisis) de las diferentes dietas (0, 1, 2 y 3% Grobionic®-A). Tratamientos con diferentes letras indican diferencia significativa (P < 0.05) evaluados con la prueba de Tukey ..... 31
3	Expresión relativa de: <i>hsp70</i> (A), <i>mga</i> (B), <i>il-1β</i> (C) y <i>apn</i> (D) en el intestino distal de <i>S. dorsalis</i> alimentados con diferentes niveles de inclusión de Grobionic®-A (0, 1, 2 y 3%) después de 42 días. Tratamientos con diferentes letras indican diferencia significativa (P < 0.05) evaluados con la prueba de Tukey ..... 32
4	Gel de electroforesis del gradiente de desnaturalización de amplicones de rDNA 16S bacterianos del contenido intestinal de <i>S. dorsalis</i> alimentados con diferentes niveles de inclusión de Grobionic®-A. La barra en la esquina superior izquierda de la figura indica la escala porcentual del coeficiente de similitud (%CS) ..... 33

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Formulación de dietas control y experimentales. ....	13
2	Pares de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-qPCR .....	24
3	Desempeño biológico y eficiencia alimenticia de <i>Seriola dorsalis</i> alimentado con diferentes niveles de Grobionic®-A después de 42 días .....	27
4	Composición proximal (% en peso seco) de los juveniles de <i>Seriola dorsalis</i> alimentados con diferentes niveles de Grobionic®-A después de 42 días .....	28
5	Actividad enzimática total en los ciegos pilóricos e intestino de los juveniles de <i>Seriola dorsalis</i> alimentados con diferentes niveles de Grobionic®-A después de 42 días .....	29
6	Actividad enzimática específica en los ciegos pilóricos e intestino de los juveniles de <i>Seriola dorsalis</i> alimentados con diferentes niveles de Grobionic®-A después de 42 días .....	30

# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1 Estado actual de la harina de pescado en la acuicultura

En las últimas décadas la demanda por productos acuícolas se ha incrementado y junto con esto, el aumento de la producción, tanto por pesca como por acuicultura, donde los peces representan una gran proporción de esta producción (FAO, 2018). Para el año 2016, se registraron alrededor de 150 millones de toneladas de la producción pesquera total y de estos, cerca de 20 millones se destinaron para fines no alimenticios, de los cuales el 76% de esta porción se utilizó para la producción de harina y aceite de pescado (FAO, 2018). Estos ingredientes son considerados ideales para la alimentación de los peces de cultivo, ya que poseen perfiles nutricionales óptimos para el desarrollo de los organismos (Hardy, 2010). Sin embargo, la producción de la harina de pescado a partir de peces completos, ha disminuido desde hace varios años, debido principalmente a las fluctuaciones de las poblaciones de los peces pelágicos pequeños, tales como la macarela o la anchoveta (FAO, 2018). Para seguir supliendo la creciente demanda de harina de pescado (HP), se aprovechan los subproductos del pescado, que anteriormente eran desechados, de tal manera que actualmente representan entre el 25 y el 35% del volumen total de la harina y el aceite de pescado producidos (FAO, 2018).

Además de la disminución de la producción de harina de pescado, el incremento en su demanda ha provocado precios cada vez mas elevados, lo que ha generado gran interés en la búsqueda de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado para la producción de alimentos para los peces carnívoros de cultivo. Por ejemplo, Tacon et al. (2011), estiman que el uso de la harina de pescado en dietas para organismos acuícolas puede reducirse en un futuro hasta en un 40-50% utilizando fuentes alternativas de proteína.

## 1.2 Fuentes alternativas a la harina de pescado

Las fuentes de proteína alternativas para la sustitución de la HP pueden dividirse en dos grandes grupos, según su origen: a) los subproductos de origen animal y b) los productos de origen vegetal.

- a) Los subproductos de origen animal, provienen de la industria del procesamiento de carnes. Algunos de estos ingredientes son considerados como buenas fuentes de energía, altos en

proteína digerible (50- 85%), buen perfil de aminoácidos y ácidos grasos esenciales, además de poseer un buen sabor, atrayente para los peces carnívoros. Sin embargo, a pesar de que estos ingredientes son buenas fuentes de lisina son pobres en metionina y cisteína (Hardy y Barrows, 2002; Oliva-Teles et al., 2015). Se ha determinado que dependiendo la fuente y la calidad nutricional estos subproductos pueden llegar a reemplazar del 20-40% a la harina de pescado (Tacon et al., 2009)

- b) Por otro lado, están los productos de origen vegetal, principalmente de plantas oleaginosas, tales como el algodón, la canola, el girasol y la soya (Hardy y Barrows, 2002; Gatlin et al., 2007). Se ha demostrado que algunas de estas presentan desventajas nutrimentales en relación a la harina de pescado, entre las que destacan su contenido proteico muy variado (38-52%), su deficiencia en algunos aminoácidos esenciales y la presencia de factores anti-nutricionales (Oliva-Teles et al., 2015). No obstante, se considera que las harinas de origen vegetal pueden llegar a reemplazar del 10 al 20% de la HP en las dietas para peces carnívoros, sin afectar su desempeño biológico (Tacon et al., 2011).

### **1.2.1 Harina de soya y sus efectos**

De las plantas con semillas oleaginosas, la harina de soya, es el ingrediente mas utilizado en la alimentación de peces en el mundo. Posee mas de 40% de proteína, según su procesamiento (Hardy y Barrows, 2002). No obstante, cuenta con una baja concentración de algunos aminoácidos esenciales, como lisina, metionina y treonina en comparación a la harina de pescado (Coelho Barone et al., 2018). Además, suele contener varios factores anti-nutricionales (FAN) que pueden reducir drásticamente su calidad nutrimental. Los FANs son metabolitos secundarios que las plantas usan como mecanismo de defensa ante depredadores, y que causan respuestas bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas en los animales que las consumen (Francis et al. 2001). La enteritis o inflamación del intestino inducida por la harina de soya, se ha observado en varios organismos, como los peces. Se he reportado que en los peces carnívoros como la totoaba (*Totoaba macdonaldi*), la alimentación por 56 días con dietas con harina de soya al 0, 22, 44 y 64%, causan respuestas dosis-dependientes severas en el intestino distal e hígado. Asimismo, se encontró un efecto negativo en el crecimiento y en la actividad de las enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, l-aminopeptidasa, proteasas alcalinas totales y amilasa) (Fuentes-Quesada et al., 2018). Por otro lado, en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) alimentado con dietas con el 0, 26, 40 y 54% de harina soya por 8

semanas, además de observar una respuesta dosis-dependiente en la gravedad de la inflamación del intestino distal, también se encontraron efectos concomitantes en las enzimas de borde de cepillo (maltasa, l-aminopeptidasa y fosfatasa alcalina) y en la expresión de genes de la respuesta inflamatoria (*il-16*, *il-8* e *il-22*, por mencionar algunos), así como en los parámetros de crecimiento (Gu et al., 2016).

Tomando en consideración las ventajas y desventajas del uso de ingredientes de origen animal o vegetal en la formulación de alimentos, se recomienda utilizar mezclas de fuentes alternativas de proteína que se complementen, como una mejor estrategia para la satisfacción de los requerimientos nutricionales de los peces (Oliva-Teles et al., 2015), así como, la inclusión de compuestos, suplementos o nutrientes que permitan mejorar su desempeño biológico y su salud.

### **1.3 Compuestos funcionales en la nutrición de peces**

El incremento en la demanda de peces cultivados conlleva una intensificación de la producción, lo que resulta en muchas ocasiones en un incremento de las densidades de cultivo y el deterioro de las condiciones ambientales en los cultivos. Esto a su vez, aumenta el riesgo a enfermedades y otros efectos adversos en la salud de los peces. Sin embargo, se ha considerado que la correcta nutrición juega un papel fundamental en el crecimiento normal y la salud de los organismos de cultivo. Además de los nutrientes esenciales, se ha demostrado que el uso de nutrientes, suplementos o compuestos, reducen la susceptibilidad de los peces a las enfermedades infecciosas y no infecciosas (Gatlin, 2002). Estos aditivos, los cuales son ingredientes que se dirigen a una o varias funciones en el cuerpo que mejoran la salud y bienestar de los animales son llamados compuestos funcionales (Oliva-Teles, 2012).

En la nutrición de peces de cultivo, se ha observado que los compuestos funcionales incrementan la tolerancia a situaciones de estrés, la resistencia a enfermedades y mejoran el desempeño biológico. Asimismo, se ha observado que mejoran la salud intestinal en peces carnívoros que se alimentan con altos niveles de ingredientes vegetales, que de otra manera pueden dañar el sistema digestivo (Oliva-Teles, 2012; Fuentes-Quesada, 2018). Entre estos compuestos se encuentran los inmunoestimulantes, probióticos y prebióticos (Oliva-Teles, 2012). Sin embargo, la diversidad de respuestas de los peces a estos compuestos, la dosis adecuada, la aceptación por parte del organismo, entre otros factores, involucran una gran diversidad de respuestas, que además son especie específicas. Por lo tanto, es necesario evaluar los efectos que el uso de estos aditivos pueden ocasionar en cada especie de interés.

Debido a que la inclusión de fuentes alternativas de proteína es cada vez más necesaria en la alimentación de los peces carnívoros de cultivo y que se ha demostrado que ciertos nutrientes funcionales pueden ayudar a mejorar el desempeño biológico, la tolerancia ante situaciones de estrés y la salud intestinal, en el presente estudio, se evaluó el efecto de Grobiotic®-A suplementado en una dieta con un alto contenido de harina de soya, en el jurel (*Seriola dorsalis*), un pez de gran importancia en la región noroeste de México.

## **1.4 Antecedentes**

### **1.4.1 Prebióticos**

Un prebiótico es aquel ingrediente no digerible, que favorece la salud del organismo al estimular el desarrollo de bacterias benéficas en el tracto digestivo (Gatlin, 2015). Se han establecido tres criterios que definen a los prebióticos: el primero, es que no deben de ser digeridos ni absorbidos en el intestino; el segundo, es que deben de ser aprovechados por la microbiota intestinal y, por último, que estimulen la actividad y/o crecimiento de las bacterias benéficas para la salud (Gibson et al., 2004).

Recientemente se ha considerado que estos compuestos pueden representar una buena alternativa para combatir a ciertos patógenos que afectan a la acuicultura, debido a que estimulan al sistema inmune (Gatlin, 2015). Los efectos de los prebióticos en los organismos acuáticos cultivados están relacionados con el incremento en la tasa de crecimiento, supervivencia, mejora de la respuesta inmune, mejor utilización de los nutrientes, solo por mencionar algunos. Por otro lado, se ha encontrado que en algunas especies pueden no tener algún efecto (Ringø et al., 2010).

Existe una amplia variedad de prebióticos, entre ellos, la inulina, fructooligosacáridos (FOS), mananoligosacáridos (MOS), galactooligosacáridos (GOS) y xilooligosacáridos (XOS) (Ringø et al., 2010), por mencionar algunos. Además existen compuestos comerciales, tales como Grobiotic®-A y Previda™, los cuales contienen galactoglucomanos y una combinación de oligosacáridos (Ringø et al., 2010). Sin embargo, debido a la variabilidad en las respuestas observadas en las diferentes especies evaluadas con el uso de prebióticos en las dietas, es necesario evaluarlos de manera especie específica.

#### **1.4.1.1 Efecto de los prebióticos en la salud intestinal de los peces de cultivo**

En los últimos años, el uso de antibióticos ha sido un tema de gran controversia debido a los daños que ocasionan en la salud y en el medio ambiente. En la acuicultura, se ha encontrado que estos compuestos químicos se acumulan en los sistemas de cultivo y en los tejidos de los organismos, lo que conlleva efectos negativos en la salud ambiental y humana, respectivamente. Aunado a lo anterior, debido a la naturaleza de la acuicultura, el daño no solo se presenta directamente en los organismos de cultivo, sino que indirectamente tiene efectos adversos en las aguas adyacentes, organismos silvestres, plancton y sedimentos (Lulijwa et al., 2019). Es por eso que algunos países han impuesto restricciones para su uso en el cultivo de organismos acuáticos. Recientemente se ha propuesto la exploración de tecnologías o estrategias alternativas al uso de antibióticos para manejar los problemas de salud en la industria (Lulijwa et al., 2019). Una de las estrategias es la manipulación y modificación de la microbiota mediante la nutrición, ya que se ha documentado que ésta es parte fundamental de diversas funciones fisiológicas que promueven el bienestar de sus hospederos (Egerton et al., 2018), tales como el mejoramiento de la digestión, de la inmunidad y de la resistencia a enfermedades (Ringø et al., 2010).

Los prebióticos están involucrados en la modificación de las características morfológicas del intestino y en los cambios en la actividad enzimática, lo que en varias ocasiones parece corresponder con el mejoramiento en el crecimiento de los peces (Anguiano et al., 2013; Xu et al., 2008). Estos cambios están asociados con el incremento en el área absorbente en el intestino y con la producción de enzimas bacterianas, que favorecen el aprovechamiento de los nutrientes (Gatlin, 2015; Ray et al., 2012). El mecanismo por el cual se producen estos cambios, está dado por la fermentación de los prebióticos por parte de algunos de los microorganismos presentes en el tracto digestivo. De la fermentación se obtienen ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés), los cuales son moléculas que proveen de energía a los distintos tipos celulares relacionados con las funciones antes mencionadas (Lauzon et al., 2014).

Además de las asociaciones antes mencionadas, los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal, funcionan como una barrera de defensa que impide la invasión de organismos patógenos, debido a la interrelación que existe con el sistema inmune, también conocido como tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés gut-associated lymphoid tissue). Rawls et al. (2004), encontraron que existen 212 genes, regulados por la microbiota intestinal, relacionados con la estimulación de la proliferación epitelial, respuesta del sistema inmune innato y metabolismo de nutrientes en el pez modelo

*Danio rerio*. Indicando la valiosa participación que tiene la microbiota en distintas funciones del organismo, que le permiten mantener un estado de salud adecuado.

Entre los genes clave relacionados con la activación del sistema inmune por prebióticos, se encuentran algunas interleucinas (Fernández-Montero et al., 2019). Estas moléculas forman parte del sistema inmune y son las encargadas de regular los procesos inflamatorios u homeostasis entre moléculas pro y anti-inflamatorias, como parte de la respuesta a infecciones bacterianas, virales y parasíticas o incluso a situaciones de estrés agudo y crónico (Abo-Al-Ela, 2018; Lokesh et al., 2012). La interleucina 1- beta (IL-1 $\beta$ ), es una citosina pro-inflamatoria y se ha observado que algunos prebióticos como los mananoligosacáridos y beta-glucanos tienen un efecto en la sobreexpresión de este gen, que en conjunto con la alta expresión de otras moléculas de respuesta inmune evaluadas (p. ej. MUC-2, IL-8, IL-10, IL-17, IgM IgT) en el intestino, propician un incremento en la resistencia a los patógenos (Fernández-Montero et al., 2019; Lokesh et al., 2012). Por otro lado, existen otras moléculas relacionadas con la respuesta inmunológica, que han sido poco estudiadas en relación con la inclusión de compuestos funcionales en las dietas, como es el caso de la proteína de choque térmico 70 (HSP70, por su nombre en inglés heat-shock protein 70), que está involucrada en la respuesta al estrés y el tráfico de proteínas (Iwama et al., 2004). Entre los pocos estudios de la HSP70 y el uso de compuestos funcionales en dietas, se ha observado que en general estos tienden a disminuir la expresión del gen en los peces evaluados (Avella et al., 2010; Rollo et al., 2006; Yarahmadi et al., 2014), y se ha hipotetizado que la administración de los compuestos funcionales pueden reducir la expresión de la HSP70, incrementando la resistencia a situaciones de estrés durante el cultivo (Yarahmadi et al., 2014).

Por otro lado, con respecto a los genes del metabolismo de nutrientes y su relación con el uso de compuestos funcionales en dietas bajas en harina de pescado para peces, hasta donde llega nuestro conocimiento, no existe información publicada. Sin embargo, es importante dilucidar el posible efecto que los prebióticos, en este caso de la formula comercial Grobiotic®-A en dietas con altos niveles de inclusión de HS, pueda tener en la expresión de los genes de dos de las enzimas del borde de cepillo intestinales, tales como la maltasa-glucoamilasa (*mga*) y la aminopeptidasa N (*apn*), las cuales están encargadas de la hidrolización de los disacáridos y de las proteínas, respectivamente. Ya que según lo publicado por Viana et al. (2019), dietas con niveles de inclusión de HS al 10, 15 y 20%, disminuyen la expresión de la *mga* y la *apn*, en el *Seriola dorsalis*. Tomando en cuenta lo anterior, se espera que el mejoramiento de la digestión y absorción de las macromoléculas antes mencionadas, esté dada por el incremento de la actividad de estas enzimas y por ende se relacione con los prebióticos suministrados en la dieta.

### 1.4.2 Grobiotic®-A

Grobiotic®-A es un compuesto comercial elaborado con levadura de cerveza parcialmente autolizada en combinación con componentes lácteos y productos secos fermentados con aproximadamente 53% de carbohidratos simples y complejos (Lochmann et al., 2010). El beneficio potencial más reconocido de este producto es la estimulación de la respuesta inmune, que se cree que está relacionada con los componentes propios de los ingredientes de este compuesto, como lo son oligosacáridos, polisacáridos, como por ejemplo el  $\beta$ -glucano, y nucleótidos (Lochmann et al., 2010; Ringø et al., 2010). Este producto ha sido evaluado en diversas especies de peces. Por ejemplo, Li y Gatlin (2004), lo evaluaron en juveniles del híbrido de lobina rayada (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) con un nivel de inclusión del 1 y 2% en las dietas. Detectaron un aumento en la eficiencia alimenticia y mayor tasa de supervivencia a un reto con *Streptococcus iniae* en ambas concentraciones (1 y 2% GBA), en comparación a los peces alimentados con la dieta basal. Mientras que Sink et al. (2007), determinaron que Grobiotic®-A al 1% es capaz de incrementar la resistencia de la carpita dorada (*Notemigonus crysoleucas*) a la bacteria *Flavobacterium columnare*.

Por otro lado, Burr et al. (2008), evaluaron el efecto del Grobiotic®-A sobre la digestibilidad de los nutrientes de dietas basadas en harina de soya (35.5%) en la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*). Los resultados del experimento mostraron que los peces alimentados con Grobiotic®-A al 1% tienen mejores coeficientes de digestibilidad aparente de los nutrientes, en comparación a los peces alimentados sin el Grobiotic®-A. Los mismos autores hipotetizan que esto puede darse por la moderación de los factores antinutricionales de la soya o por la alteración de la microbiota del intestino.

Debido a que los prebióticos pueden estimular el desarrollo y crecimiento de la microbiota intestinal y a la vez mejorar la respuesta del sistema inmune, se proponen como una alternativa para la disminución del uso de antibióticos o compuestos químicos en los cultivos de peces.

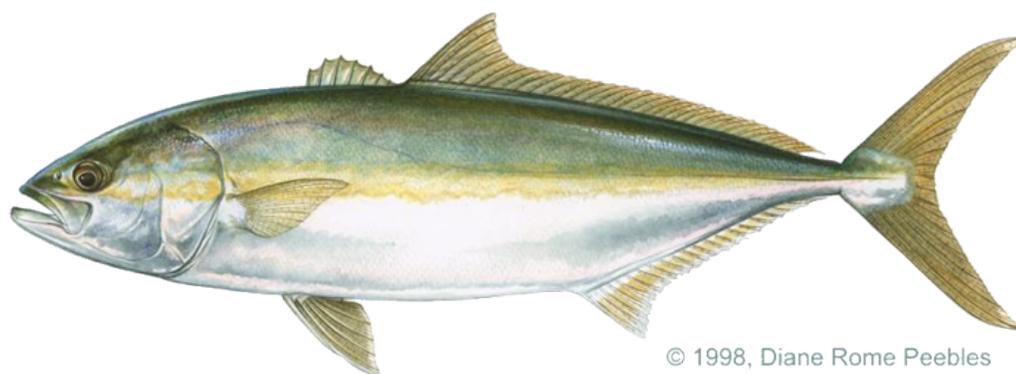
### 1.4.3 *Seriola dorsalis*

El jurel cola amarilla, *Seriola dorsalis* Gill 1863 (sinónimia de *Seriola lalandi* Valenciennes 1833; Froese y Pauly, 2019), es un organismo pelágico marino, perteneciente a la familia Carangidae, el cual se distribuye

globalmente en agua templadas a subtropicales (Fig. 1). Su dieta es carnívora y se comprende principalmente por macarela, anchoveta, sardina y calamar (Avilés-Quevedo y Castello-Orvay., 2004).

Según los registros históricos del género *Seriola*, su cultivo comenzó en 1927 de manera artesanal en Japón. Actualmente este país es el mayor productor de jurel (*Seriola quinqueradiata*) a nivel mundial. Mientras que, en México la acuicultura del jurel es reciente, ya que según los datos de la INAPESCA (2018), comenzó hace aproximadamente una década, en la región Noroeste del país.

El jurel es un pez con un gran valor comercial a nivel internacional, lo que lo ha llevado a ser un buen candidato para la acuicultura, además de que presenta cualidades que favorecen su cultivo en cautiverio, tales como su rápido crecimiento, adaptabilidad a ambientes cerrados y la ingestión de alimentos formulados (Avilés-Quevedo y Castello-Orvay, 2004).



© 1998, Diane Rome Peebles

**Figura 1.** Jurel cola amarilla de California (*Seriola dorsalis* Gill 1863). Recuperada de [https://igfa.org/game-fish-database/?search\\_type=SpeciesID&search\\_term\\_1=272](https://igfa.org/game-fish-database/?search_type=SpeciesID&search_term_1=272)

Dada la importancia de este pez a nivel comercial y al interés de disminuir el uso de la harina de pescado en la alimentación de peces de cultivo, existen algunos estudios en el *Seriola dorsalis* en los cuales se evalúan dietas bajas en harina de pescado. Buentello et al. (2015), sustituyeron la harina de pescado con distintos niveles de inclusión de harina de soya, no modificada genéticamente, pero sí con mejoras en cuanto a la reducción de FANs y el aumento de la cantidad y calidad de proteínas. Encontraron que los peces alimentados con las dietas con harina de soya tuvieron mejor rendimiento biológico que los que

fueron alimentados con la harina de pescado de referencia. Incluso observaron que a pesar de los altos niveles de soya en las dietas (50, 60 y 70%) los peces no presentaron signos de enteritis.

Chávez-García (2016), reemplazó el 25% de harina de pescado por harina de soya en el alimento y no encontró diferencias significativas en los parámetros de crecimiento, alimentación y de respuesta inmune innata entre los peces alimentados con la dieta elaborada con harina de pescado y la dieta experimental, pero si observó diferencias en la actividad de la lipasa. Asimismo, en un estudio reciente en el que se evaluó la sustitución de la harina de pescado por harina de soya (10, 15 y 20%), no se encontraron diferencias significativas en el desempeño biológico, sin embargo, si se observaron cambios en algunos parámetros sanguíneos y de expresión molecular genes de respuesta inmune (*il-1 $\beta$* , *hsp70*, *hsp90* y *bcl-2*) y de funciones digestivas (*mga*, *apn* y *ATPasa*). Además, con los niveles mas altos de inclusión de soya se encontraron signos leves de enteritis en muestras histológicas del tejido (Viana et al., 2019).

Por otro lado, en el mismo estudio de Chávez-García (2016), también se evaluó el efecto de Grobiotic®-A al 2%, tanto para las dietas con y sin harina de pescado. Los resultados demostraron que Grobiotic®-A tiene efectos positivos en el crecimiento, pero no tiene efecto en los parámetros de la respuesta inmune innata considerados en el estudio.

No obstante, la información acerca de la alimentación del jurel con dietas bajas en harina de pescado y complementadas con harina de soya y con inclusión de algún nutriente funcional, como los prebióticos es muy poca, por lo tanto, es necesario seguir evaluando los posibles efectos que estos productos le podrían conferir a este pez, tales como una mejora en la capacidad digestiva y digestibilidad, así como una sobreexpresión de genes involucrados con la salud intestinal, parámetros que han resultado ser favorecidos en otros peces al ser alimentados con Grobiotic®-A.

## 1.5 Justificación

La demanda por productos pesqueros se ha incrementado en las últimas décadas y se prevé que en el futuro, el incremento en la oferta de estos productos será principalmente por medio de la acuicultura. Sin embargo, la alimentación de los organismos de cultivo, en específico de los peces carnívoros, se basa en dietas con un alto contenido proteico. La harina de pescado es uno de los ingredientes con mayor aporte proteico, pero su producción se ha visto afectada por la sobrepesca de peces pelágicos menores. La

sustitución parcial de la harina de pescado por fuentes de proteína alternativas, como la soya, es una de las estrategias para mantener la sustentabilidad de la acuicultura en un futuro. No obstante, el uso de niveles altos de la harina de soya en la alimentación de peces carnívoros, en algunas ocasiones ha demostrado tener efectos negativos. Aunque, el uso de compuestos funcionales, como Grobiotic®-A, pueden favorecer la digestibilidad de las fuentes proteicas alternativas, además de promover un mejor desempeño biológico, salud intestinal, respuesta del sistema inmune y resistencia a patógenos. Lo que representa un gran beneficio en la formulación de dietas con fuentes alternativas de proteína y en los costos de tratamientos para la salud. Aunado a la reducción de antibióticos u otros productos químicos, dañinos para la salud humana y ambiental. Sin embargo, debido a la diversidad de fuentes alternativas y su relación con el uso de compuestos funcionales, así como a la poca información publicada sobre sus efectos en la alimentación del jurel de cultivo, especie de gran importancia en la región noroeste de México, es necesario evaluar de manera específica los efectos de una dieta baja en harina de pescado con inclusión de Grobiotic®-A.

## **1.6 Hipótesis**

La inclusión de Grobiotic®-A al 2%, en una dieta baja en harina de pescado, favorecerá el desempeño biológico, digestión, expresión de genes relacionados con la salud intestinal y la composición microbiana intestinal en juveniles de jurel cola amarilla, *Seriola dorsalis*.

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la inclusión de Grobiotic®-A en dietas suplementadas con harina de soya sobre el desempeño biológico, digestión y expresión de genes relacionados con la salud intestinal y microbiota intestinal en juveniles de *Seriola dorsalis*.

### 1.7.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto en el desempeño biológico de los juveniles de jurel alimentados con las distintas dietas con inclusión del 0, 1, 2 y 3% de Grobiotic®-A.
- Determinar el efecto de las dietas experimentales en la actividad de las principales enzimas digestivas (tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasa y amilasa).
- Evaluar el efecto de Grobiotic®-A en la digestibilidad *in vitro* de las dietas utilizando extractos enzimáticos del jurel.
- Evaluar el efecto de las dietas sobre los niveles de expresión de genes relacionados con la salud intestinal (*hsp70*, *mga*, *il-1 $\beta$*  y *apn*) en los juveniles de *Seriola dorsalis*.
- Caracterizar la composición microbiana presente en el tracto intestinal por medio del análisis de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Formulación y elaboración de dietas

Se elaboraron cuatro dietas isoproteicas (48% PC) e isolipídicas (15% LC), que cubrieron los requerimientos del jurel *S. dorsalis*. Las dietas tuvieron un nivel de sustitución del 64% de la harina de pescado con harina de soya, que de acuerdo a lo reportado por Fuentes-Quesada et al. (2018), ocasiona enteritis en peces carnívoros, como la totoaba. Se formuló una dieta basal elaborada con un bajo nivel de harina de pescado y alta en harina de soya, el control consistió en la dieta basal sin adición de Grobiotic®-A. Las dietas experimentales consistieron en la dieta basal, complementada con el 1, 2 o 3% de Grobiotic®-A (Tabla 1). Todas las dietas fueron elaboradas por el Dr. Gatlin (Texas A&M University) y se transportaron al CICESE vía aérea, en bolsas selladas. Estas se almacenaron a 4 C hasta y durante el experimento. Debido a que las dietas tenían un porcentaje de lípido menor al requerido por el jurel, se realizó un recubrimiento de las dietas ya pelletizadas. El contenido de aceite extra incluido en cada tratamiento se puede observar en la tabla 1.

### 2.2 Animales, condiciones de cultivo y diseño experimental

Se obtuvieron 300 ejemplares juveniles de jurel (*Seriola dorsalis*) de la empresa Baja Ocean Labs (Ejido Eréndira, Baja California). Los cuales fueron transportados vía terrestre, en un tanque (1000 L de capacidad) con suplementación de O<sub>2</sub>, al Laboratorio de Peces Marinos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Los peces se mantuvieron por tres semanas en aclimatación, en un sistema tipo raceway de 9 m<sup>3</sup> y alimentados con una dieta comercial (Skretting-Europa; 55% proteína y 15% lípido) a una ración diaria del 3.5% de la biomasa, suministrada en tres raciones.

Una vez alcanzada la talla deseada ( $25 \pm 4$  g; media  $\pm$  DE) y transcurrido el periodo de aclimatación, 120 peces fueron asignados aleatoriamente al sistema experimental, que estuvo compuesto por 12 tanques de 275 L conectados a un sistema de recirculación con un biofiltro de cama fija (patente 5232586, USA), un calentador de 2HP (Titan, Aqualogic, Inc, USA) y una bomba de agua de 1 HP (modelo 177954PJ, Century, USA). Se mantuvieron condiciones controladas durante todo el bioensayo de luz/oscuridad (12:12), temperatura de  $23.3 \pm 0.2$  C, salinidad de  $33.6 \pm 0.2$  ups, flujo de agua de  $3.5$  L min<sup>-1</sup>, oxígeno

disuelto de  $5.8 \pm 0.6$  mg L<sup>-1</sup> con una saturación de oxígeno por arriba de 80%. Estos parámetros fueron evaluados diariamente por medio de un medidor multiparámetro (Pro 2030, YSI, USA). Mientras que el nitrógeno amoniacal total, nitritos y nitratos, se evaluaron cada tercer día para mantener valores < 1.0 mg L<sup>-1</sup>, 0.5 mg L<sup>-1</sup> y < 80 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los niveles de nitrógeno fueron determinados por medio de un kit colorimétrico API (Mars Fishcare, North America, Inc., USA).

**Tabla 1.** Formulación de dietas control y experimentales.

Dietas experimentales	Basal	1% GBA	2% GBA	3% GBA
<b>Ingredientes (g kg<sup>-1</sup>)</b>				
Harina de pescado	154.8	154.8	154.8	154.8
Harina de soya	490.5	490.5	490.5	490.5
Concentrado de soya	163.5	163.5	163.5	163.5
Almidón	0.4	0.4	0.4	0.4
Aceite de pescado 1 <sup>a</sup>	72.5	72.5	72.5	72.5
Aceite de pescado 2 <sup>b</sup>	47.0	47.0	47.0	47.5
Gelatina	60.0	50.0	40.0	30.0
Rovimix	25.0	25.0	25.0	25.0
Stay-C	4.0	4.0	4.0	4.0
Taurina	10.0	10.0	10.0	10.0
Metionina	6.3	6.3	6.3	6.3
Lisina	7.9	7.9	7.9	7.9
Treonina	1.0	1.0	1.0	1.0
Aceite de krill	1.0	1.0	1.0	1.0
Benzoato de sodio	2.0	2.0	2.0	2.0
Cloruro de colina	1.0	1.0	1.0	1.0
Grobiotic®-A	0	10	20	30
BHT	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>Composición proximal</b>				
Proteínas	42.0 ± 2.93	41.7 ± 7.28	42.3 ± 6.12	42.0 ± 1.62
Lípidos	15.4 ± 1.31	13.0 ± 0.56	16.1 ± 3.57	13.6 ± 0.53
Humedad	5.9 ± 3.37	6.3 ± 0.12	6.5 ± 0.15	7.2 ± 0.9
Cenizas	7.5 ± 0.07	7.6 ± 0.25	7.5 0.02	7.5 ± 0.1
ELN	35.1 ± 1.35	37.6 ± 0.63	34.2 ± 3.58	36.8 ± 0.45

GBA, Grobiotic®-A. ELN, Extracto libre de nitrógeno.

<sup>a</sup>. Cantidad de aceite utilizada en la premezcla de las dietas.

<sup>b</sup>. Cantidad de aceite utilizada para el recubrimiento de las dietas pelletizadas.

Después de una semana de aclimatación en el sistema experimental, se dio inicio el bioensayo con 120 peces ( $38 \pm 3$  g), distribuidos en grupos de 10 peces en las unidades experimentales, a las cuales se les asignaron los cuatro tratamientos, cada uno con tres réplicas. Los peces fueron alimentados manualmente a saciedad aparente, a las 8:30, 12:00 y 16:00 h, durante 42 días.

## 2.3 Muestreo

Al inicio del bioensayo, y cada catorce días, se registró el peso y la longitud de manera individual de todos los organismos. Por lo que, se anestesiaron con triclaína metano sulfonato (MS-222) a diferentes concentraciones entre cada muestreo (25-100 mg/L en incrementos de 25 mg/L) en relación al incremento de peso de los peces. Al finalizar el bioensayo, el muestreo se dividió en dos partes. En la primera parte, después de 5 horas de ayuno, se realizó la biometría de todos los peces de manera individual. Se colectaron de manera aleatoria cuatro ejemplares de cada unidad experimental y se sacrificaron por sección cervical. Posteriormente se colocaron en bolsas de plástico en un contenedor con agua con hielos, con la finalidad de preservar las muestras y mantener aproximadamente los mismos tiempos de ayuno en todos los tratamientos. De los 4 organismos colectados, la mitad se dispusieron para la obtención de los ciegos pilóricos e intestino y se pesaron de manera individual. Mientras que de los dos peces restantes se obtuvo el contenido intestinal, por medio de pinzas de disección esterilizadas con alcohol entre cada pez, para la evaluación del perfil de la microbiota intestinal. Todas las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, se mantuvieron en hielo hasta finalizar el muestreo y por último se almacenaron a  $-80$  C hasta su análisis.

Para la segunda parte del muestreo, los peces se mantuvieron en ayuno por 16 horas. Se extrajeron cuatro peces por tanque de manera aleatoria. Dos de ellos se sacrificaron con una sobredosis del anestésico MS-222 (100 mg/L) y se les extrajo parte del intestino distal para los análisis de expresión genética. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL para finalmente ser conservadas en nitrógeno líquido. Los dos peces restantes se sacrificaron por sección cervical y se conservaron completos para realizar análisis de composición proximal. El manejo específico de todas las muestras se describe más adelante.

## 2.4 Parámetros del desempeño biológico

Para evaluar el crecimiento de los organismos, se obtuvieron los datos del peso inicial y cada dos semanas se realizaron biometrías en donde se registró el peso y longitud de cada uno de los peces de todos los tanques. Posteriormente, se estimó el promedio para cada unidad experimental. Los indicadores de respuesta fueron los siguientes:

### 2.4.1 Ganancia de peso

$$\text{Porcentaje de peso ganado (g)} = (\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}) / \text{Peso inicial (g)} * 100 \quad (1)$$

$$\text{Peso ganado diario (g día}^{-1}\text{)} = (\text{Peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}) / \text{duración del experimento (días)} \quad (2)$$

### 2.4.2 Coeficiente térmico de crecimiento (CTC)

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

En donde:

T = Temperatura en C

D = Duración del experimento en días

### 2.4.3 Tasa de crecimiento específica (TCE)

$$\text{TCE} = (\ln \text{Pf} - \ln \text{Pi}) * \text{D} * 100 \quad (4)$$

En donde:

Pf = Peso final (g)

Pi = Peso inicial (g)

D = Duración del experimento en días

#### 2.4.4 Índices somáticos

$$\text{Índice hepatoesomático} = (\text{Peso de hígado} / \text{peso corporal}) * 100 \quad (5)$$

$$\text{Índice viscerosomático} = (\text{Peso de las vísceras} / \text{peso corporal}) * 100 \quad (6)$$

#### 2.4.5 Factor de condición (FC)

$$\text{FC} = (\text{Peso final (g)}) * (\text{longitud corporal final (cm)})^3 * 100 \quad (7)$$

### 2.5 Eficiencia alimenticia

Diariamente se alimentaron los peces tres veces a saciedad aparente, por lo que todos los días se llevó a cabo un registro del alimento total consumido por tanque. Al final del bioensayo, se sumaron todos los registros de alimento consumido y se dividió entre el total de peces de cada tanque. Con esto en cuenta, se evaluaron los siguientes parámetros:

#### 2.5.1 Tasa de conversión alimenticia (TCA)

$$\text{TCA} = \text{Alimento consumido (g)} / \text{peso ganado (g de peso húmedo)} \quad (8)$$

### 2.5.2 Tasa de eficiencia proteica (TEP)

$$\text{TEP} = \text{Peso ganado (g)} / \text{proteína consumida (g)} \quad (9)$$

### 2.5.3 Valor productivo de la proteína (VPP)

Para calcular la relación entre la proteína consumida y la retenida en el cuerpo del pez, se evaluó el VPP. Se entiende como proteína retenida a la diferencia del peso final multiplicado por el porcentaje de proteína total presente en el cuerpo al final del bioensayo y el peso inicial por el porcentaje de proteína total al inicio del bioensayo. Mientras que la proteína ingerida es el total de alimento consumido por el porcentaje de proteína total en cada dieta.

$$\text{VPP} = \text{Proteína retenida (g)} / \text{proteína ingerida (g)} \quad (10)$$

## 2.6 Supervivencia

Cada día se observó si existían peces muertos, aunque no se encontraron peces muertos a causa de los tratamientos, en algunos tanques se registró la muerte de organismos debido a que saltaron de los tanques de cultivo. Al final del experimento se calculó la supervivencia con la siguiente formula:

$$\text{Supervivencia} = (\text{Nf} - \text{Ni}) * 100 \quad (11)$$

En donde:

Nf = número final de organismos

Ni = número inicial de organismos

## 2.7 Análisis de composición proximal

Para analizar la composición proximal tanto de los peces completos (condición inicial y final) como de las dietas utilizadas en el experimento, se siguieron los protocolos descritos en el manual de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 2005). Para la proteína cruda, se empleó el método de micro-Kjeldahl. El porcentaje de lípidos totales se cuantificó por el método extracción Soxhlet con éter de petróleo. La humedad se calculó por la diferencia del peso de la muestra húmeda y la muestra seca a una temperatura de 70 C por 72 horas. Para cuantificar el contenido de las cenizas, se incineraron las muestras en una mufla a 550 C por 4 horas. Asimismo, se obtuvo el porcentaje de extracto libre de nitrógeno por la diferencia de la suma de la proteína cruda, lípido total y cenizas menos el peso seco total de la muestra.

## 2.8 Actividad de las enzimas digestivas

Para evaluar el efecto de Grobiotic-A<sup>®</sup> sobre la actividad de las enzimas digestivas de los juveniles de jurel, se estimó la actividad de la tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasa y amilasa en muestras de los ciegos pilóricos y del intestino.

Para esto, cada muestra fue descongelada sobre hielo, cortada en piezas finas y luego se colocó en un tubo falcon de 50 mL para homogenizarlo en 10 mL de agua destilada fría por medio de un moedor de tejidos (POLYTRON<sup>®</sup> PT 1200, Kinematica AG, Switzerland). Antes de centrifugar se obtuvieron alícuotas de 0.5 mL del homogenizado para evaluar la actividad de la aminopeptidasa. El resto del homogenizado se centrifugó a 16000 g durante 30 minutos a 4 C (5417R, Eppendorf, USA), se colectó el sobrenadante y se almacenaron alícuotas de 0.5 mL. Durante todo el procedimiento, las muestras se mantuvieron en hielo. De mismo modo, todos los tubos se almacenaron a -80 C hasta su uso.

Se estimó la actividad total y específica de cada enzima para cada órgano, adecuando todas las metodologías espectrofotométricas a un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific, Finlandia). Para todos los ensayos se analizaron las muestras por triplicado, así como un blanco usando agua destilada en lugar de homogenizado y un control positivo utilizando una enzima comercial.

### **2.8.1 Tripsina**

La actividad de la enzima digestiva tripsina se evaluó siguiendo el protocolo de Erlanger et al. (1961). Se utilizó como sustrato BAPNA (N $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride) a 1 mM disuelto en 500  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) en un amortiguador Tris-HCl a 50 mM con CaCl<sub>2</sub> a 20 mM ajustado a pH de 8.2. En la microplaca se colocaron 175  $\mu$ L de la solución buffer+sustrato y 25  $\mu$ L de homogenizado. Se incubó durante 10 minutos a 37 C en el lector de placas y se detuvo la reacción con 50  $\mu$ L de ácido acético al 30%, teniendo un volumen final de 250  $\mu$ L. Finalmente, se registró la absorbancia a 410 nm después de 15 minutos de estabilización.

### **2.8.2 Leucina aminopeptidasa**

Para conocer la actividad de la leucina aminopeptidasa se siguió la metodología de Apple (1974), utilizando L-leucin-P-nitroanilide a 1.2 mM como sustrato disuelto en 1 mL de DMSO y después en buffer Tris-HCl a 50 mM y un pH de 8.0. Se colocaron 175  $\mu$ L de buffer+sustrato y 25  $\mu$ L de homogenizado en la microplaca, se incubó por 30 minutos a 37 C en el lector de placas y se detuvo la reacción con 50  $\mu$ L de ácido acético al 30%. Se cuantificó la absorbancia a 405 nm después de 10 minutos de incubación.

### **2.8.3 Lipasa**

La actividad de la lipasa fue estimada de acuerdo a la técnica propuesta por Gjellesvik et al. (1992). Para este procedimiento se empleó 4-nitrofenil-miristato a 0.56 mM como sustrato, disuelto en 1 mL de DMSO y TRIS-HCl 150 mM con taurocolato de sodio a 15 mM, como solución amortiguadora a pH 8.5. Se colocaron 200  $\mu$ L de buffer+sustrato y 25  $\mu$ L de homogenizado. La absorbancia se evaluó a 405 nm por 60 minutos a 37 C.

### 2.8.4 Amilasa

La actividad de la amilasa se determinó por la metodología descrita en el manual de enzimas de Worthington (Worthington y Worthington, 1993). Se utilizó almidón al 1% como sustrato y una solución amortiguadora de fosfato de sodio a 20 mM con cloruro de sodio a 6 mM y 1% de ácido dinitrosalicílico mezclado con 30% de tartrato potásico sódico tetrahidratado, como reactivo colorimétrico. Se colocaron 0.5 mL de homogenizado enzimático en tubos de ensayo y se incubaron en baño maría a 25 C por 4 minutos. En intervalos de tiempo de un minuto, se agregaron 0.5 mL de almidón (a 25 C). Se incubaron exactamente durante 3 minutos y en intervalos de tiempo de un minuto, se agregó 1 mL de ácido dinitrosalicílico, inmediatamente después se llevaron a baño maría a 100 C por 5 minutos. Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente, luego se agregaron 10 mL de agua destilada y se homogenizaron. Por último, se colocaron 300 µL de cada tubo en una microplaca para leer la absorbancia a 540 nm.

### 2.8.5 Actividad total y específica

La actividad de las enzimas digestivas evaluadas, se calculó tomando en cuenta que una unidad de actividad enzimática es equivalente a la cantidad de enzima requerida para incrementar una unidad de absorbancia por minuto. Por lo tanto, la actividad total tanto para los ciegos pilóricos como para los intestinos se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad total (U órgano}^{-1}\text{)} = ((\Delta \text{ Abs}/T)(\text{Vol. Rx})(\text{Vol. T. E}))/ (\text{C.E})(\text{Vol. M}))/ \text{P.O} \quad (12)$$

Donde,  $\Delta \text{ Abs}$ , es el incremento en absorbancia; T, es el tiempo de incubación de la reacción en minutos; Vol. Rx, es el volumen total de la reacción en mililitros; Vol. T. E, es el volumen total del extracto enzimático en mililitros (dado que todas las muestras se llevaron a un volumen final de 10 ml, este valor no cambió); C.E, es el coeficiente de extinción, el cual se definió como 1.0 unidad de absorbancia por minuto; Vol. M, es el volumen de muestra utilizada en la reacción, expresado en mililitros; P.O, es el peso del órgano completo en gramos, ya sean ciegos pilóricos o intestino.

Para la actividad específica, fue necesario calcular primero la concentración de proteína soluble en cada extracto enzimático. Para esto se utilizó el método colorimétrico de Bradford con un kit comercial (Quick Start™ Bradford Protein Assay, BIO RAD, USA), usando como estándar albumina de suero bovino. La

concentración de proteína soluble se calculó para cada extracto enzimático utilizando la siguiente ecuación, obtenida a partir de una recta de calibración:

$$\text{Proteína soluble (mg mL}^{-1}\text{)} = (\Delta \text{ Abs} - 0.0197) / 0.0007 \quad r^2 = 0.99782 \quad (13)$$

Una vez obtenida la proteína soluble se calculó la actividad específica de cada enzima para cada muestra con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica (U mg proteína}^{-1}\text{)} = \text{Actividad total (U tejido}^{-1}\text{)} / \text{proteína soluble (mg mL}^{-1}\text{)} \quad (14)$$

## 2.9 Digestibilidad *in vitro*

### 2.9.1 Actividad proteolítica alcalina de los extractos enzimáticos de intestino

La actividad proteolítica alcalina de los extractos enzimáticos previamente obtenidos de los intestinos de los peces colectados se cuantificó siguiendo la metodología de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984). Se utilizó caseína al 0.5% como sustrato y una solución amortiguadora de 50 mM Trizma Base-HCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0. La reacción enzimática dio inicio al mezclar 10 µL del extracto enzimático en 500 µL de una solución buffer+sustrato en un tubo eppendorff de 1.5 mL. Después de incubar las muestras a 37 C por 30 minutos, se detuvo la reacción con 250 µL de ácido tricloroacético al 20%. Se dejaron reposar las mezclas a 4 C por 20 minutos y luego se centrifugaron a 16500 x g a 22 C por 5 minutos. Se tomó 250 µL de cada sobrenadante y se colocó en una microplaca de cuarzo para evaluar la absorbancia a 280 nm con un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific, Finland). Para el caso de las muestras control, se colocó el ácido tricloroacético antes que la solución buffer+sustrato. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un 1 µg de tirosina por minuto con un coeficiente de extinción molar de 0.005 mL µg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Alarcón et al., 2002). Las ecuaciones para el cálculo de la actividad enzimática total y específica se describen en la sección 2.8.5.

### 2.9.2 Hidrólisis de las dietas utilizando la técnica de pH-stat

La digestibilidad proteica *in vitro* se cuantificó por medio del grado de hidrólisis (GH) empleando la técnica de pH-stat, determinada por la actividad de las enzimas digestivas de los intestinos de los peces, sobre la dieta utilizada para su alimentación durante el experimento (Alarcón et al., 2002; Navarrete del Toro y García-Carreño, 2002; Martínez Montaña, 2007).

Para la digestibilidad *in vitro*, se prepararon soluciones de un volumen total de 10 ml, con el equivalente a 3 unidades de actividad enzimática de cada extracto, 0.2 g de dieta (previamente molida y tamizada a 250  $\mu\text{m}$ ) y el restante de agua destilada. Las proporciones anteriores se establecieron considerando la actividad proteolítica de los extractos enzimáticos y la concentración de proteínas, tanto de las enzimas como de los sustratos (las dietas experimentales) (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2002).

Antes de agregar el extracto enzimático, se ajustó el pH de la mezcla del sustrato y agua a 8.0 con NaOH 0.1 N y a una temperatura de 37 C utilizando baño maría y con agitación constante. El curso de la reacción se registró automáticamente utilizando el titulador pH-stat 718 Titrino™ (Metrohm Ion Analysis, Suiza), durante 60 minutos.

Por último, se calculó el grado de hidrólisis de la proteína, usando la siguiente formula:

$$\text{GH (\%)} = B \times N_B \times (1/\alpha) \times (1/ M_p) \times (1/ h_{tot}) \times 100 \quad (15)$$

Donde  $B$  (ml) es el volumen de NaOH consumido durante los 60 min de digestión enzimática;  $N_B$ , es la normalidad de la solución NaOH;  $\alpha$ , es determinado por la ecuación  $\alpha = (10^{\text{pH}} - \text{pK}) / (1 + 10^{\text{pH}} - \text{pK})$ , siendo  $\text{pK}$  valores dependientes de temperatura y tamaño del péptido (Navarrete del Toro y García-Carreño, 2002). Por lo tanto, según Adler-Nissen (1986), para un pH 8.0 cercano a 37 C,  $1/\alpha$  es igual a 1.2.  $M_p$  (g) es la masa de la mezcla de la reacción, en este caso es igual a 0.1 y  $h_{tot}$  es el contenido total de enlaces peptídicos en la proteína, expresado como equivalentes de enlaces peptídicos por kilogramo o miliequivalente por gramo. Cuando  $h_{tot}$  es desconocido, se considera 8.0 meq/g como una buena aproximación (Adler-Nissen, 1986). Como blanco de la reacción, se cuantificó el grado de hidrólisis de las cuatro dietas, siguiendo la misma metodología, donde los extractos enzimáticos fueron reemplazados por un volumen igual de agua destilada.

## 2.10 Expresión de genes relacionados con la salud intestinal

Para evaluar el efecto de Grobiotic®-A en algunos parámetros de la salud intestinal de los peces, se decidió evaluar la expresión relativa de los siguientes genes: proteína de choque térmico 70 (*hsp70*), interleucina 1-beta (*il-1β*), maltasa-glucoamilasa (*mga*) y aminopeptidasa N (*apn*), donde los primeros dos genes se relacionan con la respuesta inmunológica y los dos posteriores con la digestión intestinal.

### 2.10.1 Extracción de RNA y RT-qPCR

Las muestras de intestino fueron preservadas en RNAlater (Ambion) y congeladas a -80 C hasta su procesamiento. Los tejidos fueron homogenizados con un micropistilo y posteriormente, se les extrajo de manera individual el RNA total utilizando el kit comercial NucleoSpin®RNA (Macherey-Nagel). El DNA genómico se removió mediante la digestión en columna con DNAsas a una temperatura de 37 C por 15 minutos. Se cuantificó la cantidad y calidad del RNA por medio electroforesis en gel y por espectrofotometría (Nanodrop® LITE, Thermo Fisher Scientific, USA). Donde solo las muestras de RNA dentro de una razón A260/A280nm entre 1.90 y 2.10, fueron utilizadas para la retrotranscripción.

Posteriormente se obtuvo el DNA complementario (cDNA) a partir de RNA total (500 ng) en una reacción de 20 µL con el kit de transcripción inversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, USA) y empleando los oligonucleótidos aleatorios presentes en el mismo kit, utilizando un termociclador de 96 pozos (Applied Biosystems USA). El programa de retrotranscripción consistió en 10 min a 25 C, 120 min a 37 C, 5 min a 85 C y finalmente se contuvo a 4 C. La cuantificación del cDNA se realizó por Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron utilizando un ng de cDNA, oligonucleótidos sentido y antisentido (200 nM de cada uno, indicado en la tabla 2) y SYBR® Select Master mix (Applied Biosystems, USA) en un volumen total de reacción de 10 µL, en placas de reacción MicroAmp® Fast Optical de 96 pozos (Applied Biosystems, USA) cubiertas con una película adhesiva óptica MicroAmp® (Applied Biosystems).

La cuantificación relativa de los genes se calculó mediante el método  $\Delta\Delta CT$  (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando un umbral automatizado y una línea base para determinar los valores CT. Las condiciones de la PCR fueron: (1) desnaturalización inicial y activación de la polimerasa durante 10 minutos a 95 C; (2) 40 ciclos de desnaturalización durante 15 segundos a 95 C, (3) anillado y extensión por 45 segundos a 60 C; y (6) una curva de fusión de 60 C a 95 C por 20 minutos para verificar la existencia de artefactos de cebador-dímero. La optimización de las condiciones de la RT-qPCR se realizaron con la temperatura de anillamiento (60 C), la concentración de oligonucleótido (200 nM) y la concentración del molde (cinco series de dilución

1:10 de 10 ng a 100 fg de ARN). El cDNA de tres individuos provenientes del tratamiento control se utilizaron como calibrador para todas las condiciones experimentales y genes estudiados, incluyendo el gen de referencia y se repitió para todas las placas analizadas. El gen de referencia fue  $\beta$ -actina ( $\beta$ -act) (GenBank acc. no HM754483). Mientras que los números de acceso del GenBank de los genes evaluados son: XM\_023404852 para *hsp70*, XM\_023414386 para *il-1 $\beta$* , XM\_023402980 para *mga* y XM\_023429699 para *apn*.

**Tabla 2.** Pares de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-qPCR.

Gen (símbolo)	Secuencia sentido (5' - 3')	Secuencia antisentido (5' - 3')	Tamaño (pb)	E	R <sup>2</sup>
<i><math>\beta</math>-act</i>	TGCGTGACATCAAGGAGAAG	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	175	1.00	0.99
<i>hsp70</i>	CCGGTTTGATGACACAGTTG	CGAGGTAGGCTTCAGCAATC	179	0.94	1.00
<i>il-1<math>\beta</math></i>	AGCTCTGACAGCGATCTGGT	CCGGATGTTGAAGGTTCTGT	177	0.95	0.99
<i>mga</i>	AGCCGACTCCAGCTTTAACA	GACAGAGCTGGAACCCAAGA	156	0.93	1.00
<i>apn</i>	GTGGAATGACTTGTGGCTCA	ATGTGCTCTGGCTTCAGGAT	195	0.91	1.00

Las secuencias de los oligonucleótidos, tamaños de amplicón en pares de bases (pb), eficiencias de reacción (E) y coeficientes de determinación de Pearson (R<sup>2</sup>), son indicados.

## 2.11 Perfil de microbiota intestinal

### 2.11.1 Extracción de DNA y PCR

Para estimar el perfil de la microbiota intestinal mediante la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) se enviaron las muestras del contenido intestinal de seis peces por tratamiento, al laboratorio del Dr. Gatlin (Texas A&M University) en Estados Unidos. En donde se extrajo el DNA genómico de cada muestra por medio del kit comercial Bio-Rad Aqua Pure DNA isolation (Bio-Rad, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor y con las siguientes modificaciones de Burr et al. (2009). Los pellets fueron suspendidos en 300  $\mu$ L de buffer de lisis y 20  $\mu$ L de lisozima (20 mg/mL) y mezclados con un pistilo estéril. Esta solución fue incubada a 37 C por 2 horas, posteriormente centrifugada a 20800 x g por 3 minutos y finalmente, el sobrenadante fue transferido a tubos eppendorf de 1.5 mL junto con 1.5  $\mu$ L de solución RNAasa (4 mg/mL) e incubado a 37 C por 45 minutos. El DNA extraído fue cuantificado por Nanodrop, utilizando la razón de A260/A280nm y según la concentración, las muestras se concentraron o diluyeron para tener una concentración final de 50 ng de DNA por microlitro.



## 2.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico GraphPad Prism versión 6.0, tomando en cuenta un alfa de 0.05 para todas las pruebas estadísticas. Se evaluaron los supuestos de homogeneidad de varianzas por medio de la prueba de Levene y normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, según corresponda. Mientras que los análisis de varianza se evaluaron con un ANOVA de una vía. En caso de encontrarse diferencias significativas se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey. Aquellos datos expresados como porcentajes fueron transformados con la función de arcoseno y los valores retransformados son los que se presentan como resultados (Zar, 2010).

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Parámetros de desempeño biológico y eficiencia alimenticia

Para evaluar los efectos de Grobiotic®-A en el crecimiento y la eficiencia alimenticia en los juveniles de jurel, se consideraron las variables de respuesta reportadas en la tabla 3.

**Tabla 3.** Desempeño biológico y eficiencia alimenticia de *Seriola dorsalis* alimentado con diferentes niveles de Grobiotic®-A después de 42 días.

	Basal	1% GBA	2% GBA	3% GBA	p ANOVA
<b>Pi (gr)</b>	37.90 ± 3.65	38.27 ± 3.57	37.87 ± 2.68	38.13 ± 3.03	0.96
<b>Pf (gr)</b>	158.1 ± 25.94	159.0 ± 19.8	160.0 ± 27.91	163.1 ± 23.39	0.82
<b>PG (%)</b>	317.2 ± 27.2	314.2 ± 21.3	323.0 ± 30.5	328.0 ± 29.0	0.93
<b>PGD (gr)</b>	2.9 ± 0.21	2.9 ± 0.22	2.7 ± 0.32	2.9 ± 0.24	0.93
<b>CTC</b>	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.98
<b>TCE (% día<sup>-1</sup>)</b>	3.40 ± 0.16	3.38 ± 0.13	3.43 ± 0.16	3.46 ± 0.16	0.93
<b>AC (gr/pez)</b>	181.0 ± 6.0	191.8 ± 8.85	185.1 ± 10.88	192.4 ± 16.43	0.57
<b>TCA</b>	1.5 ± 0.06	1.6 ± 0.16	1.5 ± 0.07	1.5 ± 0.01	0.61
<b>TEP</b>	1.66 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.08 <sup>ab</sup>	1.58 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.02
<b>VPP</b>	1.32 ± 0.19	1.34 ± 0.14	1.33 ± 0.09	1.41 ± 0.04	0.84
<b>IHS (%)</b>	0.91 ± 0.23	0.98 ± 0.11	0.89 ± 0.15	0.93 ± 0.13	0.64
<b>IVS (%)</b>	7.68 ± 0.59	7.73 ± 0.92	7.48 ± 1.21	7.57 ± 0.59	0.91
<b>FC</b>	1.58 ± 0.03	1.56 ± 0.10	1.58 ± 0.14	1.54 ± 0.05	0.94
<b>S (%)</b>	93.33 ± 5.77	90.0 ± 10.0	100. ± 0.0	90.0 ± 0.0	0.10

-Pi, Peso inicial; Pf, Peso final; PG, Porcentaje de peso ganado; PGD, Peso ganado diario; CTC, Coeficiente térmico de crecimiento; TCE, Tasa de crecimiento específica; AC, Alimento consumido; TCA, Tasa de conversión alimenticia; TEP, Tasa de eficiencia proteica; VPP, Valor productivo de la proteína; IHS, Índice hepatosomático; IVS, Índice viscerosomático; FC, Factor de condición, S, supervivencia.

-Valores presentados como media ± desviación estándar, por triplicado. ANOVA 1-vía (P < 0.05).

-Valores dentro del mismo renglón con diferentes superíndices indican diferencia significativa evaluada con la prueba de Tukey.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, excepto para la tasa de eficiencia proteica, en donde los peces alimentados con el 1% de GBA tienen una media significativamente menor ( $P < 0.05$ ) que el control ( $1.38 \pm 0.13$  vs  $1.66 \pm 0.07$ ), pero similar a la de los tratamientos con el 2 y 3% GBA. En cuanto a la supervivencia, es importante mencionar que ninguno de los peces murió por causa del tratamiento, sino que los pocos peces que murieron (en total 8 peces) fue por haber saltado fuera de los tanques.

### 3.2 Composición proximal de cuerpo completo

En el análisis químico proximal de proteína cruda, lípidos, cenizas y humedad del cuerpo completo de los organismos alimentados con los diferentes tratamientos no se encontraron diferencias significativas entre ellos ( $P > 0.05$ ). En la tabla 4 se observan las medias para cada tratamiento y proximal evaluado.

**Tabla 4.** Composición proximal (% en peso seco) de los juveniles de *Seriola dorsalis* alimentados con diferentes niveles de Grobiotic®-A después de 42 días.

	Inicial	Basal	1% GBA	2% GBA	3% GBA	p ANOVA
<b>Proteína</b>	63.84 ± 3.9	63.33 ± 10.56	67.54 ± 3.77	64.87 ± 2.5	69.55 ± 1.2	0.51
<b>Lípidos</b>	16.87 ± 0.52	20.69 ± 1.5	21.47 ± 0.58	22.58 ± 0.70	20.23 ± 3.74	0.53
<b>Cenizas</b>	11.43 ± 0.16	10.17 ± 0.25	10.5 ± 0.17	9.76 ± 0.53	10.46 ± 0.91	0.38
<b>Humedad</b>	73.42 ± 0.65	70.71 ± 0.36	70.83 ± 0.61	69.58 ± 0.21	70.67 ± 1.04	0.13

-Valores presentados como media ± desviación estándar por triplicado. ANOVA 1-vía ( $P < 0.05$ ).

### 3.3 Actividad de las enzimas digestivas

En la evaluación de la actividad total de la tripsina, leucina aminopeptidasa y lipasa de los ciegos pilóricos, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Mientras que, para la amilasa se encontró que los tratamientos con inclusión del prebiótico son altamente significativos en relación con el tratamiento control ( $P < 0.01$ ) (Tabla 5). Esta tendencia es similar a la que se observó en los intestinos, en donde solo se obtuvieron diferencias significativas en la amilasa ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, distinto a lo

que ocurre en los ciegos, solo el tratamiento con el 3% GBA es significativamente mas alto en relación con el tratamiento control pero no de los tratamientos con el 1 y 2% GBA (Tabla 5).

**Tabla 5.** Actividad enzimática total en los ciegos pilóricos e intestino de los juveniles de *Seriola dorsalis* alimentados con diferentes niveles de Grobionic®-A después de 42 días.

		Basal	1% GBA	2% GBA	3% GBA	p ANOVA
<b>Ciegos pilóricos</b>	<b>Tripsina (U órgano<sup>-1</sup>)</b>	20.7 ± 9.2	18.0 ± 2.1	15.6 ± 5.2	20.0 ± 3.9	0.70
	<b>L-aminopeptidasa (U órgano<sup>-1</sup>)</b>	27.1 ± 10.6	21.4 ± 3.1	33.5 ± 6.4	26.1 ± 9.8	0.38
	<b>Lipasa (U órgano<sup>-1</sup>)</b>	294.4 ± 127.8	316.2 ± 174.2	242.5 ± 61.2	375.7 ± 159.5	0.70
	<b>Amilasa (U órgano<sup>-1</sup>)</b>	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.00
<b>Intestino</b>	<b>Tripsina (U órgano<sup>-1</sup>)</b>	15.3 ± 3.0	14.5 ± 6.5	15.0 ± 2.5	18.6 ± 4.7	0.68
	<b>L-aminopeptidasa (U órgano<sup>-1</sup>)</b>	20.4 ± 6.6	15.5 ± 3.8	22.9 ± 1.9	21.1 ± 6.1	0.37
	<b>Lipasa (U órgano<sup>-1</sup>)</b>	135.3 ± 35.6	73.1 ± 34.0	88.1 ± 40.2	119.9 ± 9.7	0.14
	<b>Amilasa (U órgano<sup>-1</sup>)</b>	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.4 <sup>ab</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>ab</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.03

-Valores presentados como media ± desviación estándar por triplicado. ANOVA 1-vía (P < 0.05).

-Valores dentro del mismo renglón con diferentes superíndices indican diferencia significativa evaluada con la prueba de Tukey.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en la actividad específica de ninguna de las enzimas evaluadas de los ciegos pilóricos (i.e., tripsina, l-aminopeptidasa, lipasa y amilasa) (Tabla 6). Sin embargo, en el intestino, se observa que existen diferencias significativas tanto en la lipasa como amilasa (P < 0.05) pero no en la tripsina ni en la l-aminopeptidasa (P > 0.05). En la lipasa, se encontró que los peces alimentados con las dietas del 1 y 3% GBA son significativamente distintos, pero no lo son con respecto a la dieta basal o con la del 2% GBA. Por último, se pudo identificar que, en la amilasa, las dietas con el 2 y 3% de GBA son significativamente diferentes al control (P < 0.05), pero no respecto al 1% GBA (Tabla 6).

**Tabla 6.** Actividad enzimática específica en los ciegos pilóricos e intestino de los juveniles de *Seriola dorsalis* alimentados con diferentes niveles de Grobiotic®-A después de 42 días.

		Basal	1% GBA	2% GBA	3% GBA	p ANOVA
<b>Ciegos pilóricos</b>	<b>Tripsina (U mg Proteína<sup>-1</sup>)</b>	1.4 ± 0.8	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.2 ± 0.4	0.64
	<b>L-aminopeptidasa (U mg Proteína<sup>-1</sup>)</b>	2.0 ± 1.2	1.5 ± 0.6	2.0 ± 0.6	1.6 ± 0.9	0.85
	<b>Lipasa (U mg Proteína<sup>-1</sup>)</b>	68.1 ± 0.2	101.3 ± 34.8	70.5 ± 11.3	80.7 ± 21.8	0.38
	<b>Amilasa (U mg Proteína<sup>-1</sup>)</b>	0.02 ± 0.00	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.05	0.06
<b>Intestino</b>	<b>Tripsina (U mg Proteína<sup>-1</sup>)</b>	5.9 ± 2.9	4.0 ± 0.4	6.2 ± 2.1	8.3 ± 4.5	0.53
	<b>L-aminopeptidasa (U mg Proteína<sup>-1</sup>)</b>	7.9 ± 4.6	7.3 ± 4.0	9.3 ± 1.5	9.3 ± 4.7	0.90
	<b>Lipasa (U mg Proteína<sup>-1</sup>)</b>	48.1 ± 9.3 <sup>ab</sup>	20.5 ± 6.7 <sup>b</sup>	34.1 ± 9.6 <sup>ab</sup>	50.5 ± 9.8 <sup>a</sup>	0.03
	<b>Amilasa (U mg Proteína<sup>-1</sup>)</b>	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.01

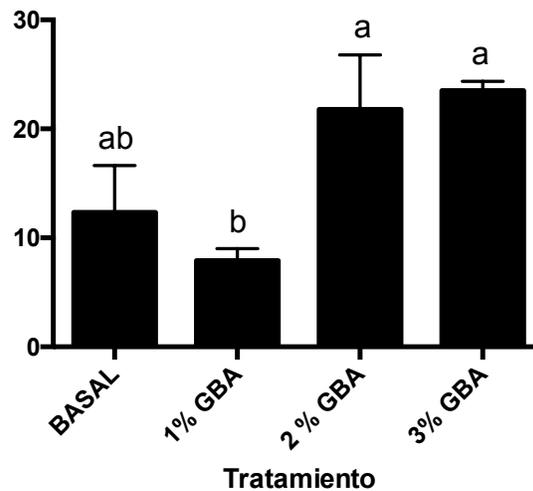
-Valores presentados como media ± desviación estándar por triplicado. ANOVA 1-vía (P < 0.05).

-Valores dentro del mismo renglón con diferentes superíndices indican diferencia significativa evaluada con la prueba de Tukey.

### 3.4 Digestibilidad *in vitro*

Los valores de la digestibilidad *in vitro* reportados en unidades de % GH de las cuatro dietas evaluadas para alimentar a los juveniles de *S. dorsalis* se reportan en la figura 2. Se encontró que existe una tendencia a incrementar la digestibilidad de la dieta conforme se aumenta el nivel de inclusión del prebiótico. En donde el nivel con el 1% de GBA es significativamente menor (P < 0.05) con una media de  $7.92 \pm 1.09$ , en comparación con las dietas con el 2 y 3% del prebiótico con una media de  $21.78 \pm 2.89$  y  $23.52 \pm 0.6$ , respectivamente. Mientras que, en la relación con la dieta basal ( $12.33 \pm 2.49$ ) no se encontraron diferencias significativas.

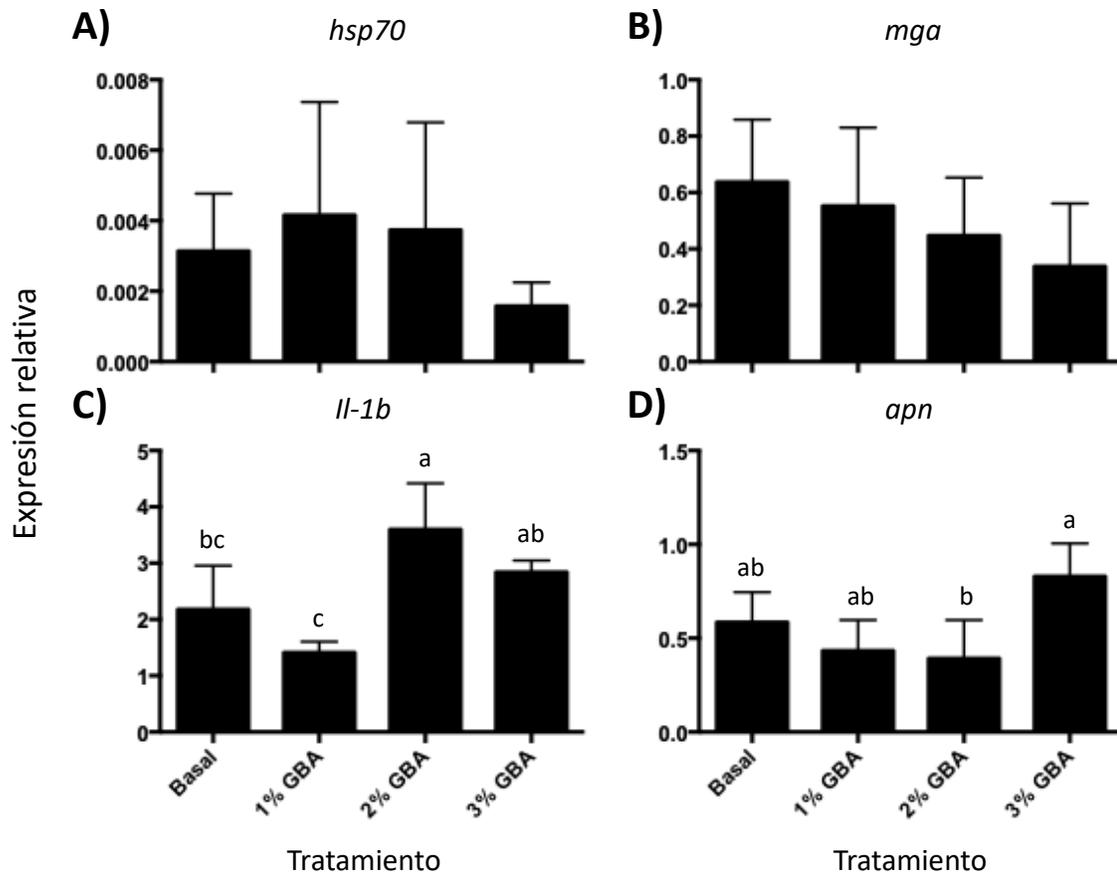
### Grado de hidrólisis (%)



**Figura 2.** Digestibilidad (% grado de hidrólisis) de las diferentes dietas (0, 1, 2 y 3% Grobiotic®-A). Tratamientos con diferentes letras indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) evaluados con la prueba de Tukey.

### 3.5 Análisis de genes relacionados con la salud intestinal

Las expresiones relativas de los genes *hsp70*, *il-1 $\beta$* , *mga* y *apn* cuantificados en el intestino distal, se ilustran en la figura 3. Se puede observar que los niveles de expresión de *hsp70* y *mga* tienden a disminuir conforme incrementa el nivel del prebiótico en la dieta, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P = 0.47$ ;  $P = 0.27$ ) (Fig. 3A-B). Por otro lado, en el gen *il-1 $\beta$* , se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) siendo el tratamiento con el 2% GBA el más alto en comparación con el tratamiento control y el del 1% GBA, pero no con la dieta del 3% GBA. Asimismo, se observó que en el tratamiento del 1% GBA hubo una expresión relativa menor en comparación con 2 y 3% GBA (Fig. 3C). La expresión de la *apn* también se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), donde el tratamiento con el 3% GBA es significativamente más alto que el tratamiento con el 2% del prebiótico, sin embargo, respecto a los tratamientos control y con el 1% GBA, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 3D).



**Figura 3.** Expresión relativa de: proteína de choque térmico (*hsp70*) (A), maltasa-glucoamilasa (*mga*) (B), interleucina-1 beta (*il-1 $\beta$* ) (C) y aminopeptidasa N (*apn*) (D) en el intestino distal de *S. dorsalis* alimentados con diferentes niveles de inclusión de Grobiotic®-A (0, 1, 2 y 3%) después de 42 días. Tratamientos con diferentes letras indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) evaluados con la prueba de Tukey.

### 3.6 Análisis de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)

El análisis de conglomerados de la composición de las comunidades bacterianas presentes en las muestras del contenido intestinal indicó que los peces alimentados con la dieta con 2 y 3% de Grobiotic®-A son similares ( $CS > 85\%$ ), pero no lo son con los peces alimentados con el 1% ( $CS \leq 79\%$ ) y a su vez estas tres dietas difieren ( $CS \leq 79\%$ ) de la composición bacteriana de los peces que recibieron la dieta sin prebióticos (Fig. 4). Por otro lado, independientemente del tratamiento, dentro de cada carril del gel se observó una banda intensa la cual indica la presencia de una sola especie o especies que contienen DNA químicamente equivalentes que dominan en el tracto intestinal de los peces evaluados, sin embargo, también se

observan algunas bandas aunque en menor intensidad, indicando la presencia de otras especies bacterianas presentes (Fig. 4).



**Figura 4.** Gel de electroforesis del gradiente de desnaturalización de amplicones de rDNA 16S bacterianos del contenido intestinal de *S. dorsalis* alimentados con diferentes niveles de inclusión de GroBiotic®-A. La barra en la esquina superior izquierda de la figura indica la escala porcentual del coeficiente de similitud (%CS).

## Capítulo 4. Discusión

---

Uno de los mas grandes retos de la acuicultura es la nutrición y alimentación de los organismos en cultivo. Es por eso que se han desarrollado diversas estrategias para cumplir con los requerimientos alimenticios y mantener la calidad de vida de los animales (Adel et al., 2017). Entre estas estrategias, se encuentra el uso de prebióticos en las dietas. Varios autores han propuesto que la mejor manera de evaluar los posibles beneficios de los prebióticos es alterando las respuestas inmunológicas o fisiológicas por medio de desafíos ambientales o dietéticos (González-Félix et al., 2018). Por otro lado, se ha reportado que para *S. dorsalis*, una dieta con el 20% de inclusión de harina de soya provocó alteraciones en la estructura intestinal, sugiriendo la presencia de enteritis (Viana et al., 2019). Tomando en cuenta lo anterior, en el presente estudio se decidió incluir el producto comercial Grobiotic®-A en las dietas elaboradas con un alto contenido de soya (64%), con la finalidad de evaluar los posibles efectos del GBA en el jurel cola amarilla, expuestos a este desafío nutricional.

En estudios previos, se han realizado diversas investigaciones para evaluar el efecto de las dietas con altos contenidos de harina de soya en los parámetros del desempeño biológico en el jurel cola amarilla. Jirsa et al. (2014), encontraron que con una dieta con el 42.8% de harina de soya, el coeficiente de crecimiento térmico fue de 0.23, el cual es muy similar al que se obtuvo en el presente estudio para todos los tratamientos (0.21). Sin embargo, difieren en el porcentaje de peso ganado reportado por los mismos autores, quienes indican una ganancia de 2362%, mientras que en el presente estudio fue de 314-328%. Por otro lado, los resultados sobre la tasa de crecimiento específica varían entre 3.38 – 3.46 % día<sup>-1</sup> en este estudio, valores que son inferiores a los reportados por Buentello et al. (2015), en juveniles de jurel alimentados con dietas con un 60% de harina de soya. Pero al contrastar los valores del presente estudio con lo encontrado por Viana y et al. (2019) en la dieta con el 20% de harina soya, nuestros valores son superiores. Lo anterior, puede estar relacionado con la calidad de la harina de soya empleada en la elaboración de las dietas, ya que Buentello et al. (2015), indican que utilizaron harinas de soya mejoradas, es decir, con reducción de factores antinutricionales y aumento de la cantidad y calidad de proteínas. Por otro lado, en cuanto a los índices viscerosomático y hepatosomáticos, Viana et al. (2019), reportaron valores muy cercanos a los encontrados en este bioensayo. Como se ha mencionado, estas similitudes y/o diferencias en los parámetros de desempeño biológico, pueden estar dadas por la tolerancia a los ingredientes vegetales por parte de los peces, el origen y calidad de los ingredientes (i.e., extrusión, hidrolización) y las tecnologías de manufactura de las dietas (Viana et al., 2019).

En el presente estudio se determinó que en general no existen diferencias significativas en los parámetros de crecimiento entre los tratamientos después de 6 semanas. A diferencia, en el híbrido de lobina rayada, se observó que a las 12 semanas hubo un efecto positivo en la ganancia de peso al alimentar con una dieta con el 31.9% de harina de soya y con el 2% de Grobiotic®-A (Li y Gatlin, 2005). Mientras que, en otra investigación en la cual se utilizó la misma especie que en el presente estudio, con el 2% GBA y el 25% de HS en la dieta, se encontró que tanto la ganancia de peso como el coeficiente de crecimiento térmico incrementó significativamente después de 8 semanas de alimentación (Chávez-García, 2016). Ambas publicaciones se relacionan en que en los dos experimentos se utilizaron concentraciones inferiores de harina de soya en la dieta (31.9 y 25%, respectivamente) en comparación a la que se empleó en las dietas elaboradas en el presente estudio (64%). Por lo que sería interesante evaluar el efecto de Grobiotic®-A con distintos niveles de inclusión de harina de soya para determinar si existe una interacción entre la concentración de soya y el prebiótico.

Por otro lado, existen estudios en otros peces carnívoros en los que se reporta que el prebiótico no resultó con efectos positivos en el crecimiento, igual que lo que observamos en el presente estudio con los juveniles de jurel. Por su parte, Buentello et al. (2010), evaluaron el efecto de la inclusión del 1% de GBA en dietas elaboradas con harina de soya al 37.5% en el *S. ocellatus*, y no encontraron diferencias significativas en el crecimiento. Los autores argumentan que esto puede deberse al tiempo de exposición a los prebióticos, ya que en su caso este parámetro fue de solo 4 semanas y probablemente no fue suficiente tiempo para que los prebióticos indujeran un cambio del microbioma. Por su parte, Burr et al. (2009), y González-Félix et al. (2018), en el *S. ocellatus* (1% GBA) y en la totoaba (2% GBA), respectivamente, coinciden que la complejidad de la comunidad microbiana presente en el intestino es un factor importante para el crecimiento de los organismos.

Tomando en cuenta lo anterior, aunque el tiempo del experimento haya sido el óptimo en el presente estudio, aparentemente no fue suficiente tiempo para que causara diferencias significativas en los parámetros de desempeño biológico, probablemente debido a la falta de diversidad bacteriana presente en los intestinos de los peces. Lo que se confirma con los resultados obtenidos del análisis del DGGE, en donde solo existe una banda dominante en todos los tratamientos.

Se ha descrito que Grobiotic®-A favorece significativamente la eficiencia alimenticia con niveles de inclusión en la dieta del 1 y 2%, tanto para el híbrido de lobina rayada y para la corvina roja (Li y Gatlin, 2004; Buentello et al., 2010). Sin embargo, para el jurel en el presente estudio no se observó el mismo efecto, puesto que no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros relacionados

con la eficiencia alimenticia. Aunque en el estudio de Chávez-García (2016) con el jurel, con el 2% GBA y con valores mucho menores de harina de soya (25%), se tuvieron valores muy cercanos a los obtenidos. Lo que podría explicarse por la calidad de la soya empleada en el presente estudio. Ya que se conoce que esta puede modificar en las dietas la palatabilidad, la cantidad de factores antinutricionales, cantidad y calidad de proteína presente, tipo y cantidad de la fuente de proteína alternativa, por mencionar algunas (Buentello et al., 2015). Sin embargo, es necesario evaluar las características antes mencionadas en cuanto a la calidad de la harina de soya, con la finalidad de caracterizar y estandarizar el tipo de soya empleada en los experimentos.

Asimismo, Rossi et al. (2015), concuerdan en que la exposición a desafíos de estrés, pueden ser una herramienta útil para evaluar los efectos de la inclusión de GBA en dietas basadas en soya, tanto en los parámetros de producción como en la respuesta inmune no-específica, ya que ellos no observaron efectos significativos en ninguno de los parámetros de desempeño biológico evaluados en el *S. ocellatus* y lo relacionan con la calidad del sistema de cultivo, el cual mencionan que fue óptimo, como lo indican el crecimiento y la supervivencia. Aunque lograron identificar que el tamaño de los peces experimentales, el ambiente de cultivo y el nivel de soya en la dieta son factores que influyen en la efectividad del GBA, no se sabe de manera clara cual es su relevancia.

La adición de GBA en las dietas no afectó los valores de proteína cruda, lípido total, humedad y cenizas del cuerpo completo de los peces evaluados en el presente estudio. Lo cual concuerda con estudios para la corvina roja con el 1 y 2% de GBA en dietas bajas en harina de pescado y para la beluga (*Huso huso*) con el 0.5, 1 y 2% (Adel et al., 2017; Burr et al., 2009; Rossi et al., 2015). En cambio para la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con inclusión del 1 y 2% de GBA en dietas comerciales, si se encontraron cambios significativos, ya que aumentó el porcentaje de proteína cruda y disminuyó el lípido total y ceniza en los peces en comparación a los alimentados con la dieta control sin GBA (Azari et al., 2011).

Las enzimas digestivas son las encargadas del rompimiento de las macro-moléculas presentes en el alimento en sus componentes menores (i.e., monómeros), con la finalidad de que los enterocitos los absorban más fácilmente (Rust, 2002). La secreción de estas enzimas se da cuando el bolo alimenticio llega al tracto digestivo (Rust, 2002). Por lo tanto, se podría suponer que la cantidad de un nutriente es equivalente a la proporción de la enzima encargada de su digestión. Sin embargo, esto no es tan simple y están involucrados muchos factores que pueden alterar ese resultado, tales como la ontogenia y la

morfología del sistema digestivo, la naturaleza del nutriente dietético y la microbiota intestinal, por mencionar algunas (Egerton et al., 2018; Gatlin et al., 2007; Rust, 2002).

En los resultados obtenidos en el presente estudio se encontró que la inclusión del prebiótico no modifica la actividad de la tripsina, leucina-aminopeptidasa, lipasa y/o amilasa en la región de los ciegos pilóricos y lo mismo para la actividad de la tripsina y la l-aminopeptidasa del intestino. Mientras que, en la lipasa y la amilasa, si se encontraron efectos significativos. En la corvina roja y en el híbrido de lobina rayada se evaluó el efecto de diferentes prebióticos, entre ellos Grobiotic®-A, con el 1% y con el 1 y 2% de inclusión, respectivamente (Anguiano et al., 2013). La actividad específica de las enzimas digestivas intestinales (tripsina, aminopeptidasa, lipasa y amilasa) después de 4 u 8 semanas de alimentación no cambió significativamente. Estos resultados concuerdan con los observados en el presente estudio con respecto a la actividad de la tripsina y la l-aminopeptidasa, pero difieren en cuanto a la lipasa y la amilasa.

De la misma manera, en el estudio de Chávez-García (2016) antes descrito, con el jurel alimentado con una dieta enriquecida con el 2% de GBA, no se encontraron diferencias significativas en las actividades de la tripsina y la amilasa en el intestino. Por otro lado, Azari et al. (2011), evaluaron el efecto del 1 y 2% de GBA en la trucha arcoíris y encontraron que en comparación con la dieta control (sin GBA), la actividad específica de la proteasa, amilasa y lipasa, se incrementó conforme aumentó el nivel del prebiótico, tanto en el estómago y ciegos pilóricos como en el intestino. Al comparar este resultado con los obtenidos en el presente estudio, se observa que la actividad de la amilasa en el jurel aleta amarilla tiene la misma tendencia de aumentar conforme se incrementa el nivel de inclusión de Grobiotic®-A. Mientras que para la lipasa, a pesar de que el efecto tiende a aumentar con los niveles de inclusión del prebiótico, al contrastarlo con el control no se detectan efectos significativamente positivos.

Uno de los principales efectos positivos reportados de los prebióticos es que favorecen la colonización de microorganismos benéficos en el intestino y como se mencionó anteriormente, la actividad de las enzimas digestivas puede ser alterada por la microbiota presente en el tracto digestivo, por medio de la secreción de enzimas exógenas bacterianas, tales como las amilasas (Azari et al., 2011; Burr et al., 2008; Ray et al., 2012). Por lo tanto, se podría hipotetizar que el efecto encontrado en este estudio sobre la actividad de las amilasas puede estar relacionado con cambios en la microbiota intestinal. Adicionalmente, se ha reportado que, al utilizar prebióticos en la corvina roja, el efecto significativo sobre algunas enzimas como la aminopeptidasa, la amilasa y la fosfatasa alcalina es mayor solo en periodos cortos (4 semanas), pero no en periodos mas largos (8 semanas) (Anguiano et al., 2013). Lo anterior podría ayudar a explicar la falta de efectos significativos obtenidos para algunas de las enzimas evaluadas en el presente estudio, puesto

que se puede considerar que el tiempo de exposición al prebiótico fue largo (6 semanas) para la edad y la especie evaluada.

En cuanto a la digestibilidad de las dietas, se observó un incremento significativo en el grado de hidrólisis de las proteínas conforme se incrementó el nivel de inclusión de GBA. Estos resultados son difíciles de comparar ya que, para nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se evalúa la digestibilidad de las dietas con inclusión de Grobiotic®-A para el *S. dorsalis*. Además, no existe información publicada empleando la técnica de digestibilidad *in vitro* al evaluar el efecto de Grobiotic®-A. No obstante, entre los pocos estudios publicados, Burr et al. (2008), observaron que en la corvina roja, la inclusión de GBA al 1% en una dieta con un 35% de harina de soya mejoraba la digestibilidad *in vivo* aparente de los nutrientes y al compararla con una dieta basada en harina de pescado no encontraron diferencias significativas, es decir, el prebiótico en una dieta baja en harina de pescado tiene la misma digestibilidad que una dieta basada en harina de pescado. Lo cual indica que al igual que los resultados obtenidos en el presente estudio, GBA tiene efectos positivos en el aprovechamiento de los nutrientes en dietas basadas en soya. En contraste, en la carpa dorada (*Carassius auratus*), que son peces omnívoros, alimentada con dietas similares a las que utilizaron Burr et al. (2008), se encontró que la inclusión del 1% de Grobiotic®-A no tenía un efecto significativo en la digestibilidad aparente de ningún de los nutrientes evaluados. Estos resultados pueden estar explicados por el tamaño del pez utilizado, la especie y los hábitos alimenticios en relación a la morfología intestinal (Raggi y Gatlin, 2012).

Como se mencionó anteriormente, la morfología intestinal es uno de los factores que puede modificar la digestibilidad de las dietas. Esto se debe a que la digestibilidad, esta comprendida por dos procesos: (1) la digestión, que corresponde a la actividad de las enzimas digestivas y (2) la absorción de las moléculas a través de las células intestinales (Rust, 2002). Por lo tanto, cualquier modificación en la superficie intestinal repercute en la digestibilidad de los nutrientes. La inclusión de Grobiotic®-A en las dietas ha demostrado en algunos casos, como en la trucha arcoíris, incrementa la actividad de las enzimas digestivas y esto se relaciona directamente con el mejoramiento del crecimiento, mediante el incremento de la digestión y absorción de los nutrientes (Azari et al., 2011). Mientras que, en otros peces como la corvina roja no se tiene muy clara la relación que existe entre el mejoramiento de los parámetros biológicos y se considera que más bien eso está influenciado por la modificación significativa de la histomorfología intestinal, causada por la fermentación de los prebióticos a ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés) por parte de la microbiota intestinal, que a su vez incrementan la absorción de nutrientes y la digestibilidad (Anguiano et al., 2013; Schley y Field, 2002). Tomando en cuenta lo anterior y de acuerdo a los resultados obtenidos para la actividad enzimática en el presente estudio, GBA podría tener un efecto

similar en el jurel. Es decir, que el mejoramiento de la digestibilidad en las dietas, puede estar dado por una modificación positiva de la superficie intestinal, incrementando la absorción de nutrientes. Sin embargo, esto se tendría que evaluar mediante una comparación de cortes histológicos de los intestinos de los peces alimentados con las diferentes dietas (Fuentes-Quesada, 2018).

Los prebióticos, probióticos y polisacáridos adicionados a las dietas, pueden estimular el sistema inmune de los peces y ayudar en la defensa contra patógenos o estrés (Kiron, 2012). Se considera que estas sustancias tienen el potencial de activar la defensa inmune innata de los peces, ya sea a nivel de receptores celulares y/o genes relacionados con el sistema inmune (Bricknell y Dalmo, 2005).

Existe poca información acerca del efecto de Grobiotic®-A en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune. Sin embargo, la acción de otros prebióticos como los manan-oligosacáridos (MOS y cMOS) y de beta-glucanos se han evaluado en diversas ocasiones. En un estudio sobre el efecto de MOS y cMOS y su combinación, en la expresión de genes clave del sistema inmune del *Seriola dumerli*, se encontró que ambos prebióticos inducen una sobreexpresión de algunos genes en el intestino, pero solo MOS tiene un impacto en la regulación positiva de la *il-1 $\beta$* . La expresión de los genes seleccionados en dicho artículo, revela un incremento en la respuesta de las citosinas y de la producción de mucus, la cual resulta una mejor defensa contra parásitos (Fernández-Montero et al., 2019).

Los resultados antes descritos se asemejan a los obtenidos en el presente estudio, donde se observa un incremento significativo en la expresión relativa de la *il-1 $\beta$*  en el tratamiento con el 2% GBA en comparación con los tratamientos control y con el 1% GBA. Sin embargo, en el tratamiento con el 3% GBA no se observó este efecto. La ausencia de un efecto positivo del tratamiento con el 3% GBA, puede ser explicada por una sobreestimulación del sistema inmune, la cual puede saturar a la célula, impidiendo cumplir con su función (Klenerman et al., 2002), tal como ocurrió en el estudio de Fernández-Montero et al. (2019), en donde encontraron que la combinación de MOS y cMOS causa esta respuesta.

A pesar de que no hay antecedentes con relación al efecto de Grobiotic®-A en la expresión de genes, ante un reto de estrés nutricional, como el que se propuso en el presente estudio. Se ha encontrado que, en el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua* L.) expuesto a un reto parasítico con *Vibrio anguillarum*, existe una sobreexpresión significativa de la *il-1 $\beta$*  en la sección posterior del intestino al comparar la dieta control (óptima) y la dieta con inclusión de MOS, solo después del reto bacteriano. Es decir, el prebiótico puede modular la expresión del gen en un escenario de estrés. Lo que concuerda con otros resultados obtenidos en el mismo artículo, en donde se observa que no hay diferencias en los niveles de expresión de la *il-1 $\beta$*  en

respuesta a MOS, antes de la exposición de los peces al reto, lo que indica que en situaciones normales (sin estrés), MOS no altera la homeostasis inmune intestinal (Lokesh et al., 2012). Este efecto de la sobreexpresión de la *il-1 $\beta$* , está relacionado con la actividad de las bacterias intestinales, las cuales a partir de la fermentación del prebiótico producen SCFAs. Estas moléculas reducen el requerimiento de glutamina por parte de las células epiteliales, dejando así que la glutamina sea distribuida a otras células, como las del sistema inmune. Durante el proceso de estrés, cuando las células inmunes están mayormente activas, requieren de niveles más altos de glutamina y MOS resulta indirectamente beneficioso (Lokesh et al., 2012; Schley y Field, 2002). Por lo tanto, se podría hipotetizar que el estrés que podría ocasionar la dieta alta en soya, empleada en este experimento, de alguna manera favorece la expresión del gen de la *il-1 $\beta$*  y es por eso que se observan valores más altos en los tratamientos con el 2 y 3% de GBA.

De igual manera, se evaluaron los niveles de expresión de la *hsp70*, la cual es una proteína relacionada con el tráfico de proteínas dentro de las células bajo condiciones de estrés. Se encontró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, pero si es posible observar que con el 1 y 2% de GBA, se induce una expresión más alta que la dieta control, que puede ser el efecto resultante de la fermentación bacteriana presente en el intestino, puesto que se ha detectado que estos productos pueden estimular la producción de HSPs (Petrof et al., 2004). En contraste, la dieta con el 3% de GBA provoca una expresión mucho menor de la *hsp70*, lo que podría explicarse de manera similar a lo que ocurre con la *il-1 $\beta$* , en donde la saturación del prebiótico genera una sobreestimulación del sistema inmune y las células pierden la capacidad de responder (Klenerman et al., 2002). Sin embargo, algunos autores recomiendan interpretar cuidadosamente la expresión de este gen, debido a que su respuesta es muy susceptible a diversas variables ambientales (Iwama et al., 2004).

Como se ha mencionado, los prebióticos pueden mejorar la salud intestinal de los peces. Las enzimas *mga* y *apn*, las cuales son enzimas del borde de cepillo del intestino, se utilizaron como indicadores de los efectos de Grobiotic®-A en respuesta a la inclusión soya en la dieta y se observó que los niveles de expresión de la *mga*, no difirieron significativamente entre las cuatro dietas, no obstante, se observó una tendencia decreciente en relación con la inclusión del prebiótico. Viana et al. (2019), observaron que en el *S. dorsalis* la expresión de la *mga* se reduce en medida que se incrementan los niveles de soya en la dieta. Como se ha mencionado, en este estudio los peces fueron alimentados con dietas altas en soya (64%), por lo tanto, es probable que la soya esté teniendo un fuerte impacto en las células del borde de cepillo del intestino, lo que impide encontrar un posible efecto en la expresión de la *mga* al incluir el prebiótico. Sin embargo, lo anterior debe ser evaluado mediante histología del tejido intestinal.

En cambio, en la evaluación de la expresión de la aminopeptidasa N (*apn*) se observó que en los peces que obtuvieron la dieta con el 3% de GBA el nivel de expresión fue mas alto que el de los peces alimentados con las tres dietas restantes. Este efecto también fue observado al evaluar la actividad digestiva de la leucina aminopeptidasa, en donde el nivel del 3% GBA fue el que obtuvo mayor actividad en comparación con los otros tratamientos, aunque no se encontraron diferencias significativas. Esto indica que alimentar con un 3% de GBA podría favorecer la digestión de las proteínas.

En el presente estudio, el perfil de DGGE mostró una banda intensa, en cada uno de los tratamientos, lo que indica que independientemente del nivel de inclusión de GBA en las dietas, la comunidad microbiana intestinal del jurel está dominada por una sola especie o varias especies con DNA químicamente equivalente y al compararlo con otras especies como la totoaba y el híbrido de lobina rayada, a las cuales también se les suministró GBA, parece ser muy simple, ya que en estos organismos se observó un patrón de bandas mas amplio, lo que indica que hay una mayor diversidad microbiana (Burr, et al., 2010; González-Félix et al., 2018). Sin embargo, para juveniles de corvina roja, también se ha detectado la presencia de una sola banda dominante y los autores comentan que posiblemente esto se debe a que la comunidad microbiana en el intestino en un sistema de recirculación cerrado no tuvo la oportunidad de madurar como para detectar diferencias significativas (Burr, 2007; Burr et al., 2009). No obstante, al evaluar las mismas dietas en organismos sub-adultos de la misma especie, el perfil de DGGE fue mas complejo y estuvo influenciado por la adición de GBA en las dietas (Burr, 2007). De acuerdo a lo antes descrito, posiblemente ese fenómeno sea el mismo que pueda explicar la simplicidad de los resultados en el perfil de DGGE en este estudio, ya que los especímenes estudiados también eran organismos juveniles y, por lo tanto, tampoco tuvieron la oportunidad de madurar o desarrollar un microbioma intestinal más complejo.

Aunque al comparar los porcentajes del coeficiente de similitud se detecta que los peces alimentados con las dietas con el 2 y 3% de GBA tienen una diversidad bacteriana más similar en relación con el 1% y el control, es poco probable que las bacterias relacionadas con las bandas presentes en niveles menores que la banda dominante, tengan un efecto significativo en la comunidad bacteriana del intestino (Raggi y Gatlin, 2012). Lo que podría explicar la carencia de efectos positivos en algunos de los parámetros evaluados en los juveniles de jurel en este estudio.

En conclusión, la suplementación con el 2 y 3% de Grobionic®-A en dietas con un nivel alto de harina de soya (64%) para juveniles del jurel cola amarilla, mejoró la actividad enzimática de la amilasa, la digestibilidad de la proteína de las dietas e incrementó el nivel de expresión del gen de respuesta inmune,

la *il-1 $\beta$* . La similitud entre ambos tratamientos se relaciona con la similitud de la comunidad microbiana presente en el intestino. Por lo tanto, se recomienda emplear el 2% de GBA en dietas con niveles altos de soya para reducir el uso de la harina de pescado y por ende el costo en la alimentación del jurel.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

- La suplementación de Grobionic®-A en dietas altas en proteína vegetal (i.e., HS de buena calidad) no tiene efectos negativos en el crecimiento o la eficiencia alimenticia en juveniles del jurel cola amarilla en un periodo de 42 días.
- De acuerdo a los índices somáticos y al factor de condición, el jurel (*Seriola dorsalis*) tiene una alta tolerancia a niveles de harina de soya relativamente elevados (64%), cuando esta última es de buena calidad.
- La inclusión del 1% de GBA en las dietas disminuyó la actividad específica de las lipasas en el intestino. Mientras que la actividad específica de las amilasas incrementó significativamente en los peces alimentados con al menos el 2% de GBA en la dieta.
- La digestibilidad de las dietas con el 2 y 3% de GBA es significativamente mayor en comparación con el 1% GBA, pero no en comparación a la dieta control, lo que sugiere que GBA no tiene efecto en la digestibilidad de las proteínas presentes en la dieta con el 64% de harina de soya, al ser evaluadas con una técnica *in vitro*.
- La inclusión del 2% de GBA incrementa la expresión relativa del gen de la interleucina-1 $\beta$  en el intestino, dando indicios a que probablemente exista un mejoramiento de la respuesta inmune de los juveniles de jurel.
- El 3% de suplementación con GBA favorece la expresión relativa del gen de la aminopeptidasa N, así como de la actividad digestiva de la l-aminopeptidasa en muestras de tejido intestinal del jurel, lo que puede relacionarse con una mayor digestión de las proteínas presentes en las dietas con altos niveles de harina de soya.
- La composición de la microbiota intestinal, evaluada por DGGE, es más similar entres los peces alimentados con el 2 y 3% de GBA, comparados con los alimentados con 1% o la dieta control. Razón que puede explicar la similitud de los resultados obtenidos entre estos tratamientos para la actividad enzimática de las lipasas y amilasas, digestibilidad y expresión del gen de la *il-1 $\beta$* .

## Capítulo 6. Recomendaciones

---

- Debido a que se consideró que la harina de soya utilizada para la elaboración de las dietas empleadas en este experimento fue de buena calidad, se propone utilizar una harina con una menor calidad, de tal manera que puedan producirse daños en la salud intestinal del jurel y observar los efectos del GBA cuando el pez se considera enfermo.
- Evaluar la calidad de la harina de soya antes de incluirla a las dietas, para caracterizar los compuestos presentes en el producto.
- Evaluar histológicamente los intestinos para observar si existen efectos en sus diferentes secciones del intestino y presencia de cambios en su morfología que se relacionen con el grado de absorción de los nutrientes.
- Caracterizar el microbioma intestinal para determinar su relación con Grobiotic®-A y como afecta en los aspectos del crecimiento, utilización de alimento, digestión y salud de los peces.
- Ampliar la cantidad de genes relacionados con el desempeño biológico y la salud de los peces. Así como su evaluación antes y después del bioensayo, con la finalidad de determinar el progreso del estado del pez en relación con el prebiótico.
- Exponer a los peces a un reto bacteriano o parasítico para evaluar su respuesta inmune de los peces después de alimentarlos con Grobiotic®-A.

## Literatura citada

---

- Abo-Al-Ela, H. G. 2018. An introduction to selected innate immune-relevant genes in fish. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(2), 955–976.
- Adel, M., Safari, R., Yeganeh, S., Binaii, M., Ghiasi, M., Ahmadvand, S. 2017. Effect of dietary GroBiotic®-A supplementation as a prebiotic on the intestinal microflora, growth performance, haemato-serological parameters, survival rate and body composition in juvenile beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Aquaculture Nutrition*, 23, 492–499. doi:10.1111/anu.12417
- Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishing, London.
- Alarcón, F. J., Moyano, F. J., Díaz, M. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 697–704. doi:10.1002/jsfa.1100
- Anguiano, M., Pohlenz, C., Buentello, A., Gatlin III, D. M. 2013. Effects of prebiotics on the digestive enzymes and gut histomorphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *British Journal of Nutrition*, 109, 623-629.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*. Association of Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Apple, W. 1974. Leucine Aminopeptidase Determination with L-leucineamide as Substrate. En: Bergemeter, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, United States of America. pp. 291-300.
- Avella, M. A., Olivotto, I., Silvi, S., Place, A. R., Carnevali, O. 2010. Effect of dietary probiotics on clownfish; a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298, 359-371.
- Avilés-Quevedo, M. A. Castelló-Orvay, F.C. 2004. *Manual para el Cultivo de Seriola lalandi (Pisces: Carangidae) En Baja California Sur, México*. Instituto Nacional de Pesca. Dirección General de Investigación en Acuicultura. Secretaría de Acuicultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 64 p.
- Azari, A. H., Hashim, R., Rezaei, M. H., Baei, M. S., Roohi, A., Darvishi, M. 2011. The Effects of Commercial Probiotic and Prebiotic Usage on Growth Performance , Body Composition and Digestive Enzyme Activities in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Applied Sciences Journal* 14 (Special Issue of Food and Environment), 14, 26–35.
- Buentello, J. A., Jirsa, D., Barrows, F. T., Drawbridge, M. 2015. Minimizing fishmeal use in juvenile California yellowtail , *Seriola lalandi* , diets using non-GM soybeans selectively bred for aquafeeds. *Aquaculture*, 435, 403–411. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.10.027
- Buentello, J. A., Neil, W. H., Gatlin III, D.M. 2010. Effects of dietary prebiotics on the growth, feed efficiency and non-specific immunity of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* fed soybean-based diets. *Aquaculture Research* 41, 411-418.

- Burr, G. 2007. Effects of prebiotics on growth performance, nutrient utilization and the gastrointestinal tract microbial community of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) and red drum (*Sciaenops ocellatus*). Ph.D. Dissertation. Texas A&M University, College Station, Texas.
- Burr, G., Gatlin III, D. M., Hume, M. 2009. Effects of the Prebiotics GroBiotic®-A and Inulin on the Intestinal Microbiota of Red Drum , *Sciaenops ocellatus*. *Journal of the world aquaculture society*, 40(4), 440–449.
- Burr, G., Hume, M., Neil, W.H., Gatlin III, D.M. 2008. Effects of prebiotics on nutrient digestibility of a soybean-meal-based diet by red drum *Scianops ocellatus* (Linnaeus). *Aquaculture Research* 39, 1680-1686.
- Burr, G., Hume, M., Ricke, S., Nisbet, D., Gatlin III, D. M. 2010. In Vitro and In Vivo Evaluation of the Prebiotics and Galactooligosaccharide on the Digestive Microbiota and Performance of Hybrid Striped Bass ( *Morone chrysops* × *Morone saxatilis* ). *Microbiology Ecology*, 59, 187–198. doi:10.1007/s00248-009-9597-6
- Chávez-García, D. S. 2016. Efecto del suplemento de prebiótico Grobiotic®-A en la dieta sobre el crecimiento, la capacidad digestiva y la respuesta inmune no específica de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, Baja California. 76 pp.
- Coehlo Barone, R. S., Yokoyama Sonoda, D., Kleber Lorenz, E., Possebon Cyrino, J.E. 2018. Digestibility and pricing of *Chlorella sorokiniana* meal for use in tilapia feeds. *Scientia Agricola*, 75 (3), 184-190.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross R.P. 2018. The Gut Microbiota of Marine Fish. *Front. Microbiol.* 9:873.
- Erlanger, B. F., Cohen, W., Kokowsky, N. 1961. The Preparation Chromogenic and Properties of Two New Substrates of Trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 271–278.
- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Fernández-Montero, Á., Torrecillas, S., Izquierdo, M., José, M., Milne, D., Secombes, C., Sweetman, J., Da Silva, P., Acosta, F., Montero, D. 2019. Increased parasite resistance of greater amberjack ( *Seriola dumerili* Risso 1810 ) juveniles fed a cMOS supplemented diet is associated with upregulation of a discrete set of immune genes in mucosal tissues. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 35–45. doi:10.1016/j.fsi.2018.10.034
- Francis, G., Makkar, H.P., Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199, 197–227. doi:10.1016/s0044-8486(01)00526-9
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2019. FishBase. *Seriola dorsalis* (Gill, 1863). Accessed through: World Register of Marine Species at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=302510> on 2019-07-28.
- Fuentes-Quesada, J.P. 2018. Optimization of alternative ingredients in low fishmeal diets using functional nutrients in *Totoaba macdonaldi* juveniles. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, Baja California. 135 pp.

- Fuentes-Quesada, J.P., Viana, M.T., Rombenso, A.N., Guerrero-Rentería, Y., Nomura-Solís, M., Gomez-Calle, V., Lazo, J.P., Mata-Sotres, J.A. 2018. Enteritis induction by soybean meal in *Totoaba macdonaldi* diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture*, 495, 78-89.
- Gatlin III, D.M. 2002. Nutrition and Fish Health. En: Halver J. E. y Hardy R. W (Ed.). *Fish Nutrition* (Third Edition). Academic Press. San Diego, California, United States of America. pp. 672-702.
- Gatlin III, D.M. 2015. Prebiotics. En: Lee, C.S., Lim, C., Gatlin III, D.M, Webster, C.D. (Ed.). *Dietary nutrients, additives, and fish health*. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, United States of America. pp. 271-281.
- Gatlin III, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G.S., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*. 38, 551e579.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., Roberfroid, M. B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17, 259–275.
- Gjellesvik, D.R., Lombardo, D., Walther, B.T. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 123-134.
- González-Félix, M. L., Gatlin III, D. M., Urquidez-Bejarano, P., Reé-Rodríguez, C. De, Duarte-Rodríguez, L., Sánchez, F., Casas-Reyes, A., Yamamoto, F. Y., Ochoa-Leyva, A., Perez-Velazquez, M. 2018. Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth , innate immune responses , and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 491, 239–251. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.03.031
- Gu, M., Bai, N., Zhang, Y., Krogdahl, A. 2016. Soybean meal induces enteritis in turbot *Scophthalmus maximus* at high supplementation levels. *Aquaculture* 464, 286-295.
- Hardy, R.W., Barrows, F.T. 2002. Diet Formulation and Manufacture. En: Halver J. E. y Hardy R. W (Ed.). *Fish Nutrition* (Third Edition). Academic Press. San Diego, California, United States of America. pp. 505-600.
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquacult. Res.* 41, 770e776.
- INAPESCA. 2018. Acuacultura Jurel. Recuperado el 18/09/20 de: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-jurel>
- Iwama, G. K., Afonso, L. Q., Todgham, A., Ackerman , P., Nakano, K. 2004. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish?. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 15-19.
- Jirsa, D. O., Stuart, K. R., Salze, G. P., Rhodes, M. A., Davis, D. A., Drawbridge, M. A. 2014. Limiting Amino Acids in Practical Diets for California Yellowtail , *Seriola lalandi*. *Journal of the world aquaculture society*, 45(6), 681–690. doi:10.1111/jwas.12158

- Kiron, V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 111–133. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015
- Klenerman, P., Cerundolo, V., Dunbar, P.R. 2002. Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools. *Nature Review Immunology*. 2(4), 263–272.
- Lauzon, H. L., Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Ringø, E., Davies, S. J. 2014. Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. En: Merrifield, D. L., Ringø, E. (Ed.). *Aquaculture Nutrition: Gut health, Probiotics and Prebiotics*. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, United States of America. pp. 169-184.
- Li, P., Gatlin III, D. M. 2004. Dietary brewer's yeast and the prebiotic GroBiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, 231(1-4), 445–456.
- Li, P., Gatlin III, D. M. 2005. Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquaculture*, 248, 197–205. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.005
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods*, 25 (4), 402–408.
- Lochmann, R., Sink, T. D., Phillips, H., Chen, R. 2010. Evaluation of a Dietary Dairy–Yeast Prebiotic in Juvenile Golden Shiners in Ponds. *North American Journal of Aquaculture*, 72(2), 164–171. doi:10.1577/a09-029.1
- Lokesh, J., Fernandes, J. M. O., Korsnes, K., Bergh, Ø., Brinchmann, M. F., Kiron, V. 2012. Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or  $\beta$ -Glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33, 626–631. doi:10.1016/j.fsi.2012.06.017
- Lulijwa, R., Rupia, E.J., Alfaro, A.C. 2019. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*. 1-24.
- Martínez Montaña, E. 2007. Digestibilidad proteica en el lenguado de California (*Paralichthys californicus*): Ontogénesis y comparación de dos métodos de evaluación in vitro. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, Baja California. 110 pp.
- Navarrete del Toro, M. A., García-Carreño, F. L. 2002. Evaluation of the Progress of Protein Hydrolysis. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 10(1), B2.2.1-B2.2.14. doi:10.1002/0471142913.fab0202s10
- Oliva-Téles, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*. 35, 83e108.
- Oliva-Téles, A., Enes, P., Peres, H. 2015. Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. En: Davis A. (Ed.), *Fed and Feeding Practices in Aquaculture*. Wood head Publishing: Oxford, United, Kingdom, pp. 203-233.

- Raggi, T., Gatlin III, D. M. 2012. Prebiotics Have Limited Effects on Nutrient Digestibility of a Diet Based on Fish Meal and Soybean Meal in Goldfish. *North American Journal of Aquaculture*, 74(3), 400–407. doi:10.1080/15222055.2012.675997
- Rawls, J.F., Samuel, B.S., Gordon, J.I. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *PNAS*, 101 (13), 4596-4601.
- Ray, A. K., Ghosh, K., Ringø, E. 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18, 465-492.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., Bakke, A. M. 2010. Prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117–136.
- Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., Cresci, A. Carnevali, O. 2006. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32 (2), 167-177.
- Rossi, W., Tomasso, J. R., Gatlin III, D. M. 2015. Production performance and non-specific immunity of cage-raised red drum, *Sciaenops ocellatus*, fed soybean-based diets. *Aquaculture*, 443, 84–89. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.03.012
- Rust, M. 2002. Nutritional Physiology. En: Halver J. E. y Hardy R. W (Ed.). *Fish Nutrition (Third Edition)*. Academic Press. San Diego, California, United States of America. pp. 368-452.
- Schley, P.D. y Field, C.J. 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87 (2), 221-230.
- Sink, T.D., Lochman, R.T., Goodwin, A. E., Marecaux, E. 2007. Mortality rates in golden shiners fed high-fat diets with and without a dairy-yeast prebiotic before challenge with *Flavobacterium columnarum*. *North American Journal of Aquaculture*, 69, 305-308.
- Tacon, A.G.J., Hasan, M.R., Metian, M. 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans. Trends and prospects. En: *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*.
- Tacon, A.G.J, Metian, M., Hasan, M.R. 2009. *Feed Ingredients and Fertilizers for Farmed Aquatic Animals*. FAO.
- Viana, M. T., Rombenso, A. N., Del Rio-Zaragoza, O. B., Nomura, M., Diaz-Argüello, R., Mata-Sostres, J. A. 2019. Intestinal impairment of the California yellowtail, *Seriola dorsalis*, using soybean meal in the diet. *Aquaculture*, 513(August), 734443. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734443
- Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: Bergmeyer H. J. (ed.). *Methods of enzymatic analysis*. Vol. V. Verlag Chemie. Weinheim, Germany. 270-277 p.
- Worthington Biochemical Corporation. 1993. Alpha amylase. En: Worthington, V. (Ed.), *Worthington Enzyme Manual: Enzymes and Related Biochemicals*.
- Xu, B., Wang, Y, Li, J., Lin, Q. 2009. Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 351-357.

Yarahmadi, P., Miandare, H.K., Farahmand, H., Mirvaghefi, A., Hoseinifar, S.H. 2014. Dietary fermentable fiber upregulated immune related genes expression, increased innate immune response and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 41 (2), 326-331.

Zar, J.H. 2010. *Biostatistical Analysis*. 5th Edition, Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River, 944 p.