

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS CENTRO DE
INVESTIGACIONES COSTERAS**

T E S I S

**Efecto de la temperatura sobre la microbiota
en totoaba (*Totoaba macdonaldi*) durante el
desarrollo larval**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA Y
MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS**

PRESENTA

Jaris Rutila López Castañón

Tonalá, Chiapas

15 de Enero de 2026





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Tonalá, Chiapas
18 de noviembre de 2025

C. Jaris Rutila López Castañón

Pasante del Programa Educativo de:

Licenciatura en Biología marina y Manejo integral de cuencas

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Efecto de la temperatura sobre la microbiota en totoaba (*Totoaba macdonaldi*) durante el
desarrollo larval

En la modalidad de: Tesis profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Mtro. José Reyes Díaz Gallegos

Mtra. Natalia Perales García

Dr. Arkady Uscanga Martínez

Firmas:

[Firma]
[Firma]
[Firma]

Ccp. Expediente

2025, Año de la mujer indígena
Año de Rosario Castellanos



Pág. 1 de 1
Revisión 1

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES
DE CHIAPAS**
**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS CENTRO DE
INVESTIGACIONES COSTERAS**

T E S I S

**Efecto de la temperatura sobre la microbiota
en totoaba (*Totoaba macdonaldi*) durante el
desarrollo larval**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA Y
MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS**

PRESENTA

Jaris Rutila López Castañón

DIRECTOR

Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza
Universidad Autónoma de Baja California

CO-DIRECTOR

Dr. Arkady Uscanga Martínez
Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas
Centro de Investigaciones Costeras

ASESOR

Dr. Ernesto Larios Soriano
Universidad Autónoma de Baja California



DEDICATORIA

Para Reynaldo y Mireya

Mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A la facultad de Ciencias Marinas de la UABC Ensenada, en especial a todo el equipo del Laboratorio de Nutrición acuícola, por abrirme las puertas y hacerme sentir como en casa.

Al Centro de Investigaciones Costeras, de la UNICACH, por proveerme de conocimientos y aspiraciones, por ser mi hogar durante la licenciatura.

Al Dr. Mario Alberto Galaviz por tomarme de la mano y guiarme pasó a pasó en este proyecto.

Al Dr. Ernesto Larios por su tiempo y paciencia, por hablar conmigo con sinceridad y a motivarme para lo que viene.

A mí querida Sam técnico del laboratorio de nutrición acuícola, que ha sido de gran apoyo en esta última etapa, por sus consejos y sus abrazos tan cálidos.

Al Dr. Arkady Uscanga por ser mi mentor, inspirarme a ir por más y a darme la oportunidad de explorar.

A mí querido Biol. William Rodríguez, al Ing. Jorge, a la Lic. Adriana Cano, a la Lic. Jesica por sus consejos y abrazos que siempre me acompañaron en este viaje.

Al Dr. Francisco Javier Toledo por brindarme su confianza y apoyo.

A las personas que me eligieron para ser padres, los primeros maestros en mi vida, por su amor incondicional. Los amo profundamente.

A mis amigos de Ensenada, la bella Yatzumi Matsumoto por dejarme dormir en su cuarto en aquellas noches difíciles y de mostrarme su cariño cocinándose, a Brandon Rangel y padres por su compañía y compartirme su cariño, en una ciudad extraña para mí.

A mis dos hermosas amigas Ariadna y Mari Carmen que me acompañan siempre, con cariño y mucho amor.

A mi respetado profe Ricardo Suaste y esposa por hacerme reír tanto y darme lecciones constantemente a través de la natación, siempre por hacerlo mejor, *“e/ hecho de ir cansado no significa que lo harás mal”*.

A mi familia de Te Mana Nui por ser el toque artístico en mi vida, y enseñarme de disciplina y compromiso.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORICO.....	4
2.1 TAXONOMÍA Y BIOLOGÍA DE TOTOABA.....	4
2.2 HISTORIA DE TOTOABA MACDONALDI.....	5
2.3 BIOLOGÍA DE TOTOABA EN CULTIVO.....	6
2.3.1 Etapa larvaria	7
2.3.2 Etapa juvenil.....	8
2.3.3 Etapa adulta	8
2.4 ONTOGENIA Y FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA DIGESTIVO EN LARVAS DE PECES MARINOS	8
2.4.1 Boca, cavidad bucal y faringe	9
2.4.2 Esófago	9
2.4.3 Estómago.....	10
2.4.4 Intestino	10
2.4.5 Recto	11
2.4.6 Ciegos pilóricos	11
2.4.7 Páncreas, hígado y vesícula biliar.....	11
2.5 ONTOGENIA DIGESTIVA DE TOTOABA.....	12
2.6 MICROBIOTA.....	12
2.7 COMPOSICION Y DIVERSIDAD MICROBIANA EN PECES	13
2.8 EFECTO TÉRMICO EN LA MICROBIOTA.....	16
2.9 GEN 16S rRNA	16
III. ANTECEDENTES	18
IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	20
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4.3 HIPOTESIS.....	20
V. MATERIALES Y METODOS	21
6.1 OBTENCION DE LARVAS	21
6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	22
6.3 PROTOCOLO DE ALIMENTACIÓN	22
6.4 CRECIMIENTO.....	23

6.5 TOMA DE MUESTRA PARA METAGENOMICA.....	23
6.6 EXTRACCIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN.....	24
6.7 PROCESAMIENTO DE SECUENCIAS.....	25
6.8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	25
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	26
VI. RESULTADOS	28
7.1 CRECIMIENTO	28
7.2 ANALISIS DEL GEN 16S ARNr	29
VII. DISCUSIÓN	35
VIII. CONCLUSION.....	40
IX. REFERENCIAS.....	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación de totoaba (<i>T. macdonaldi</i>)	4
Figura 2 Área de larvario en unidad de Biotecnología de piscicultura	22
Figura 3 Graficas de peso y longitud, correspondientes a las temperaturas experimentales (20, 26, 28° C	29
Figura 4 Análisis de profundidad de secuenciación	30
Figura 5 Principales 15 familias asociadas a las temperaturas (20, 26, 28° C)	31
Figura 6 Tendencias sobre las temperaturas (20, 26, 28° C) en DPH 7 y 24	32
Figura 7 Índices de OTUs observados alfa según la temperatura de las larvas de Totoaba macdonaldi. T (tratamientos), n (número de muestras).....	33
Figura 8 Índice de Shannon.D (diversidad), T (tratamiento).	34

RESUMEN

Las condiciones ambientales amenazan la supervivencia de los cultivos de peces marinos, especialmente durante la etapa larval, dado que en este periodo los organismos son particularmente vulnerables a factores de estrés. En los últimos años, se ha profundizado en el estudio del cultivo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de Baja California, con el fin de encontrar condiciones óptimas para su cultivo. En ese sentido la temperatura se considera una fuente de estrés en los ambientes acuáticos, siendo uno de los factores abióticos que determinan una serie de respuestas fisiológicas y metabólicas, la cual interfiere en el crecimiento y desarrollo de los organismos. El objetivo del presente estudio fue conocer el efecto de la temperatura sobre la microbiota durante la etapa larval de *T. macdonaldi* a través del análisis del gen 16S rRNA. Esta investigación se llevó a cabo en un sistema de cultivo de recirculación, durante un periodo de 24 días, con larvas recién eclosionada y cultivadas a diferentes temperaturas (20, 24, 26 y 28° C). Se evaluó el crecimiento mediante longitud total (mm) y pesos finales (g) con error estándar, donde se observó que la temperatura a 26° C obtuvo el mayor registro de peso y longitud final de (0.078 ± 0.02 g) y (2.03 ± 0.27 cm). Este patrón sugiere que la temperatura de 26° C se encuentra dentro del rango óptimo fisiológico para *T. macdonaldi*, promoviendo una mayor eficiencia en procesos metabólicos asociados al crecimiento. En cuanto a la microbiota, tanto para el análisis de unidades taxonómicas observadas (OTUs) e índice de Shannon. se observó diferencias significativas en el T28, quien presento mayor riqueza observada con una mediana que va de 45 - 27 OTUs, sugiriendo que a esta temperatura y tiempo de desarrollo se alcanza una mayor complejidad microbiana, en contraste, los tratamientos T20 y T26 a 24 DPH (día post eclosión) los cuales mostraron una menor riqueza y una distribución más homogénea (medianas de 36 y 30 OTUs, respectivamente), lo que podría ser un reflejo de comunidades más estables o dominadas por un menor número de taxones. El índice de Shannon, que combina riqueza y equitatividad, mostró patrones distintos. A los 7 DPH, se evidencio una disminución de la diversidad con el aumento de la temperatura. Sin embargo, a los 24 DPH, esta tendencia se invirtió parcialmente, y la variabilidad sugiere que el impacto de la temperatura en la

diversidad microbiana no es lineal y puede depender del estado fisiológico de las larvas y de la etapa de desarrollo, lo que puede indicar a una comunidad menos diversa, pero más especializada y eficiente, capaz de contribuir de manera más directa al crecimiento del hospedador.

Derivado de los resultados del presente estudio, se concluye que la temperatura de 26° C se identificó como la condición óptima para maximizar el peso y la longitud larval, asociándose además con una microbiota más equilibrada y funcional a lo largo del desarrollo.

Crecimiento, estrés térmico, gen16S rRNA.

I. INTRODUCCIÓN

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es un pez marino perteneciente a la familia *scianidae*, endémico del Golfo de California, es una especie que tuvo un impacto en su población debido a una importante pesquería que se presentó durante primera mitad del siglo XX en el alto Golfo de California (Cabrera, 2017).

Sin embargo, a partir de 1993, en la facultad de ciencias marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, se inició el desarrollo y cultivo en cautiverio con fines de repoblación (True, 2012). Actualmente, la totoaba se cultiva en centros de investigación y granjas comerciales situadas en el Golfo de California, posicionándola como un producto acuícola de relevancia comercial para la región noroeste de México (López et al., 2015).

No obstante, para lograr una producción exitosa de especies nativas en cautiverio, es crucial contar con información detallada sobre sus aspectos biológicos y nutricionales, para asegurar la obtención de alevines y juveniles para su desarrollo y supervivencia, (Domingo y Fernández, 2011; Dávila *et al.*, 2018).

En ese sentido las condiciones ambientales amenazan la supervivencia de los cultivos de peces marinos, especialmente durante la etapa larval, ya que en este periodo los organismos son particularmente vulnerables a factores de estrés como la mala calidad del agua, la hipoxia, las fluctuaciones de salinidad y temperatura (Mata, 2015).

La temperatura se considera una fuente de estrés en los ambientes acuáticos, siendo uno de los factores abióticos que determinan ciertos parámetros de las actividades vitales de los peces (Golovanova, 2013; Yang et al., 2022). Cuando la temperatura del agua varía, los peces experimentan una serie de respuestas fisiológicas y metabólicas (Volkoff y Ronnestad, 2020); alterando su digestión, comportamiento, crecimiento, desarrollo y reproducción (Golovanova, 2013; Li, 2024); las cuales pueden comprometer la salud y supervivencia de las larvas (Suzzi et al., 2023).

Uno de los órganos involucrados en el sistema inmunológico y endocrino de estos organismos es el intestino (Zhu et al., 2013); en él se encuentra un ecosistema microbiano compuesto por procariotas, arqueas y eucariotas como levaduras, algunos protozoos y hongos, lo cual resulta vital para la salud de los peces (Li, 2024), ya que puede medir el bienestar de los organismos a través de indicadores fisiológicos y conductuales (Bernard et al., 2020). En virtud de su influencia en una amplia gama de procesos biológicos de su huésped, como la digestión, la inmunidad innata, y funcional del intestino (Rawls, 2007) además de su naturaleza sensible a los factores estresantes (Boutin et al., 2013, Webster et al., 2019).

El aumento de la temperatura puede alterar el equilibrio de los organismos que habitan en la flora intestinal de los peces, y conducir a condiciones que pueden favorecer el crecimiento excesivo de ciertas especies bacterianas, incluidos los patógenos oportunistas (Austin et al., 1995; Xia et al., 2014) que pueden provocar enfermedades gastrointestinales (Neuman et al., 2014). Es por ello, que los estudios sobre la modulación de la microbiota debido a cambios medioambientales durante las primeras etapas de cultivo pueden ser relevante para poder establecer protocolos óptimos de cultivo que puedan ayudar a mejorar las tasas de sobrevivencia durante estas primeras etapas garantizando así, el éxito del cultivo.

Algunos estudios recientes comienzan a arrojar información relevante sobre este tema, sin embargo, se han centrado principalmente en los efectos de la dieta sobre la microbiota intestinal (Pérez et al., 2024b). Sin profundizar significativamente en el papel de otros factores ambientales, como la temperatura, en la modulación de la microbiota; esta brecha en el conocimiento es particularmente relevante en el caso de la *T. macdonaldi*, un pez endémico del Golfo de Baja California, una especie clave tanto para la biodiversidad marina como para la acuicultura.

Por tal motivo es importante saber acerca de cómo estos cambios afectan al microbiota de *T. macdonaldi*, especialmente durante su fase larval, una etapa crucial en el ciclo de vida del pez, que está asociada a su desarrollo inmune y crecimiento.

Este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la temperatura sobre la microbiota de *T. macdonaldi* durante el desarrollo larval. En ese sentido los resultados de esta investigación podrían brindar información crucial para mejorar las prácticas de manejo y cría de esta especie en condiciones de cautiverio.

II. MARCO TEORICO

2.1 TAXONOMÍA Y BIOLOGÍA DE TOTOABA

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert, 1891) es un pez marino perteneciente a la familia scianidae, el cual presenta la siguiente clasificación taxonómica.

Pertenece al:

Orden: Peciformes

Suborden: Percoidei

Familia: Sciaenidae

Género: *Totoaba*

Especie: *Macdonaldi*.

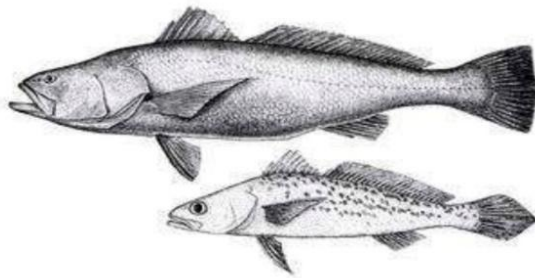


Figura 1 Representación de totoaba (*T. macdonaldi*)

Forma adulta (superior) y juvenil (inferior). Fotografía tomada de (Cabrera 2017a).

Es uno de los especímenes de mayor tamaño del Mar de Cortez, se puede encontrar hasta los 50 m de profundidad (True et al., 1997). En general habitan aguas poco profundas cerca de las regiones continentales y se caracterizan por tener una aleta dorsal larga, parcial o completamente separada en radios suaves y duros.

La familia Scianidae tienen la habilidad de producir sonidos con la vejiga natatoria por lo que se les conoce como peces roncadores, tambores o corvinas (True 2012a).

Se alimenta principalmente de crustáceos y peces; Puede llegar a medir 2 m de largo y pesar hasta 150 kg (Cisneros et al., 1995; Ramcharitar et al., 2006; Valenzuela et al., 2011; Coronel, 2016).

En cuanto a su biología reproductiva, estos peces carnívoros alcanzan la madurez sexual entre los 6 y 7 años. Además, estudios basados en los otolitos indican que pueden vivir hasta 25 años (Flessa et al., 2001).

Por otro lado, migran y utilizan el Alto Golfo de California (UGC) como zona de desove y criadero. En particular, la desembocadura del río Colorado sigue siendo un ambiente adecuado para su reproducción, a pesar de la degradación del hábitat en la región (Román-Rodríguez y Hammann, 1997; Cisneros-Mata et al., 1997; Valenzuela-Quiónnez et al., 2015; Rodríguez-García et al., 2020).

2.2 HISTORIA DE TOTOABA MACDONALDI

A principios del siglo XX, la pesquería de totoaba se vuelve una de las pesquerías más importantes en el norte de México, los primeros registros corresponden al año 1920, en este periodo se pescó sin restricciones con el objetivo de satisfacer la alta demanda de la vejiga natatoria, a lo que comúnmente se le conoce como “buche” en el mercado asiático (Flanagan y Hendrickson, 1976). Debido a la demanda de la vejiga natatoria, en 1942 se capturaron 2,261 toneladas de totoaba, dato que representa la captura más grande de la que se tiene registro, por tal motivo las poblaciones comenzaron a disminuir alrededor de 1960 (Arvizu y Chávez 1972; Valenzuela et al., 2015) hasta llegar a una situación más crítica lo que originó que se declarara el cierre de la pesquería en los años 70 (Arvizú y Chávez, 1972).

En 1975, ante la situación, el gobierno de México decretó una veda total indefinida (Diario oficial de la Federación, 1975). Posteriormente en 1976 *T. macdonaldi* fue clasificada en peligro de extinción por la convención internacional para el Tráfico de Especies en Peligro (apéndice 1) y en 1979 por el Servicio Nacional de Pesquerías

Marinas de los Estados Unidos de America (registro federal 44 (99): 29478-29480).

Ante el estado crítico de las poblaciones de *T. macdonaldi*, el gobierno de México autorizó el registro de algunas Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMAs) por parte de la Dirección General de Vida Silvestre (DGVC) perteneciente a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Estas UMAs fueron autorizadas con el objetivo de realizar trabajos de investigación que permitieran generar información sobre aspectos de reproducción, aprovechamiento extractivo y repoblamiento (CEMDA, 2017).

Actualmente los programas que existen bajo la figura de UMA son: Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora- Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), Earth Ocean Farms S.A. de C.V.; 4. Pacifico Acuaculture S.A de R. L. de C.V.; 5. Frutos del Mar sección Bahía de Altata y 6. Cygnus Ocean Farms S.A. de C.V./DNEB (CEMDA, 2017). En cuanto a la liberación de organismos con fines de repoblamiento sólo se tiene información de las UMA a cargo de la UABC, la cual liberó 101, 270 ejemplares en un periodo comprendido entre 1997 a 2016; del CREMES que liberó 134,722 peces entre 2012 a 2016 y de Earth Ocean Farms que liberó 16,500 juveniles entre 2015-2016, lo que da un total de 252,492 ejemplares liberados al medio natural (CITES, 2016).

2.3 BIOLOGÍA DE TOTOABA EN CULTIVO

La biología de totoaba es compleja y multifacética, por lo que una serie de investigaciones proporcionan información sobre las etapas de crecimiento en producción las cuales se definen como huevo, larva (que constituye cuatro fases larvales), juvenil y etapa adulta.

Inicial: (3 DPH), temprana (4-17 DPH), intermedia (17-22 DPH) y madura (22 DPH), donde alcanzan las características morfológicas de la especie con aletas desarrolladas y comportamiento más activo (Stores, 2010).

Juvenil (24 DPH), que, en condiciones de cultivo, son alimentados con una dieta seca comercial hasta que alcanzan un peso promedio de 152 g y 20 cm (50 DPH), para ser transferidos a sistemas de engorde donde alcanzan tamaños comerciales entre 2 y 8 kg en un período de 3 a 5 años (True, 2012), y por último, la etapa adulta que se alcanza cuando los peces tienen entre 6 y 8 años.

2.3.1 Etapa larvaria

La etapa larvaria es sumamente importante para el desarrollo de la especie en las que se requiere establecer rutinas adecuadas de alimentación y destete.

El ano y la boca se abren a los 4 y 5 DPH, iniciando la diferenciación completa de todos los órganos digestivos. En esta etapa la actividad enzimática cumple un rol importante dentro del tracto gastrointestinal, se ha detectado tripsina, quimotripsina y pepsina (Galaviz et.,al 2013), así como carboxipeptidasa A y leucina aminopeptidasa (Córdova et.,al,2019), en el momento de la eclosión con tripsina y quimotripsina que permanecen inactivas durante la absorción del saco vitelino y se activan después de abrir la boca, mientras que la activación de la pepsina se produce a los 10 DPH (Galaviz et.,al 2013) la expresión génica de la pepsina se detecta a los 16 DPH, antes de la formación del estómago (20 DPH), mientras que la actividad alcanza su punto máximo a los 40 DPH cuando el sistema digestivo está morfológicamente completamente desarrollado (24 y 28 DPH) (Galaviz et al.,2015).

Además, se ha detectado actividades de lipasa, amilasa y proteasa alcanina a 2 DPH con un máximo entre 20 y 32 DPH, y la carboxipeptidasa A y la leucina aminopeptidasa se detectan a los días 2 y 3 DPH con actividades máximas a 3 y 22 DPH, respectivamente (Córdova, et.,al 2019).

Una de las características morfológicas que exhibe totoaba durante la etapa larvaria, es la presencia de aproximadamente 20 manchas de pigmento en la serie ventral de la cola, dos manchas de pigmento entre los dieciséis y dieciocho miómeros dos pequeñas manchas de pigmento entre los 16 y 18 miómeros dos

pequeñas manchas de pigmento estrelladas en los dos primeros miomeros dorsales (Díaz, et.,al 2013)

2.3.2 Etapa juvenil

Con el sistema digestivo desarrollado, la absorción de aminoácidos ayuda a mantener un equilibrio saludable y funcional como leucina, treonina y lisina (Rosas et.,al 2008). Por otro lado, las vitaminas C y E forman parte de la primera línea de defensa (Velez, et.,al 2014).

2.3.3 Etapa adulta

En esta etapa el sistema digestivo es altamente especializado, el cual refleja su estricta dieta carnívora. El estómago de la totoaba adulta, la pepsina es responsable de la digestión primaria de las proteínas a un pH ácido (pH 2); en el intestino, las principales son las metaloproteasas (amino y carboxipeptidasas) y las serina proteasas (tripsina y quimotripsina) a pH alcalino (pH 10), y la presencia de ocho isoformas de proteasas con alta capacidad proteolítica e hidrolítica para diversas fuentes proteicas hace que la Totoaba tenga un sistema digestivo de un carnívoro estricto (Córdova-Montejo et al.,2019).

2.4 ONTOGENIA Y FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA DIGESTIVO EN LARVAS DE PECES MARINOS

La mayoría de los peces marinos, en los cuales el estómago aparece después de iniciar la alimentación exógena, existiendo en algunas especies hasta cierto desfase entre su aparición y funcionalidad (Lauff y Hoffer, 1984). En la mayoría de las larvas de peces marinos recién eclosionadas, el tracto digestivo es un tubo recto sin diferencias histológicas que descansa dorsalmente sobre la vesícula vitelina, el cual está cerrado por ambos extremos (boca y ano), hasta después de la absorción de

las reservas vitelinas diferencian las regiones del sistema digestivo histológicas y funcionalmente (Govoni, 1980).

La ontogenia del sistema digestivo de las larvas de peces marinos ha sido objeto de numerosos estudios en las dos últimas décadas. Más allá del interés científico, diversas investigaciones se han enfocado en elucidar cómo satisfacer las necesidades de crianza de larvas de peces marinos en cantidades importantes ya que se considera que esta etapa de desarrollo es la más vulnerable (cuello de botella) en el cultivo de peces marinos. El tubo o tracto digestivo se puede dividir en boca, cavidad bucal, esófago, estómago (ausente en peces agástricos), intestino (anterior y posterior) y recto, e incluye las distintas válvulas y esfínteres musculares que controlan el flujo del alimento (Alarcón, 1997).

2.4.1 Boca, cavidad bucal y faringe

Estas estructuras están asociadas con la predigestión del alimento (selección, orientación y deglución). Al contrario de los peces carnívoros, los peces agástricos carecen de dientes en sus mandíbulas y cuando están presentes sólo participan en la captura del alimento y manejo de la presa. En algunos ciprínidos, que carecen de estómago, la presencia de dientes faríngeos que disgregan parcialmente el alimento ayuda al proceso digestivo intestinal (Hickling, 1966). La lengua normalmente es un órgano poco desarrollado, excepto en los peces carnívoros, que contribuye a la retención de las presas y como órgano sensorial.

2.4.2 Esófago

El esófago, corto y extensible, no está claramente separado del estómago (a través del cardias) o en su caso del intestino. Su función esencial, en la nutrición es la de lubricar el alimento que pasa al estómago o intestino. Además, algunos autores han descrito la presencia de glándulas que secretan enzimas proteolíticas (pepsinógeno) en la mucosa del esófago (Kapoor et al., 1975; Anderson, 1991). En la mayoría de los peces, el conducto aéreo de la vejiga natatoria (Ductus pneumaticus) desemboca en este segmento del sistema digestivo.

2.4.3 Estómago

No todos los peces poseen estómago e incluso dentro de la misma familia puede haber especies en las que este órgano esté ausente. Al igual que los vertebrados superiores, el estómago de los peces posee la misma organización tisular desde la cavidad peritoneal hasta la luz estomacal (serosa-muscular-mucosa). Se puede dividir en dos regiones: la anterior y la pilórica.

En la primera se localizan la mayoría de las células gástricas, que en el caso de los teleósteos secretan tanto HCl como pepsinógeno. La zona pilórica suele contribuir al triturado y mezcla del alimento antes de pasar al intestino a través del esfínter pilórico. En algunos peces el estómago es un órgano muy extensible. Así, la ingestión abundante de alimento puede provocar en la trucha arcoíris una dilatación del estómago del 30-35% en longitud y del 75% en diámetro (Alarcon, 1997; Guillaume et al., 2001 y ZamboninoInfante et al., 2008)

2.4.4 Intestino

El intestino de los peces está formado por un epitelio columnar simple de células de ribete en cepillo, que es característico de tejidos capaces de absorber (Krementz y Chapman, 1975). El borde de ribete en cepillo de estas células juega un papel importante en el proceso digestivo, ya que incrementa la superficie de contacto de las células intestinales con los nutrientes, aumentando la superficie de digestión y absorción en comparación con un epitelio liso. Al contrario que la longitud intestinal, la superficie intestinal relativa (cm²) disminuye a medida que el pez crece (Steffens, 1989).

En la mayoría de los peces se distinguen dos regiones intestinales diferenciadas teniendo en cuenta su función:

1. La región anterior, zona que recibe las secreciones pancreáticas y biliares, está caracterizada por la presencia de gran cantidad de quilomicrones (inclusiones lipídicas) en sus células epiteliales.
2. La región posterior, caracterizada por una elevada actividad pinocitótica de sus células epiteliales y la presencia de gránulos intracelulares con macromoléculas protéicas (Boge y Peres, 1983).

2.4.5 Recto

La parte terminal del intestino está normalmente diferenciada en un verdadero recto, la cual está demarcada por la válvula ileorectal (Anderson, 1986), pero en algunas especies no está presente y es sustituida por un ligero adelgazamiento del intestino ocasionado por un anillo muscular (Mohsin, 1962). En el epitelio rectal tiene lugar la absorción de agua, iones y algunas proteínas (Bullock, 1967, Mena et al., 2008)

2.4.6 Ciegos pilóricos

Algunas especies de peces poseen como formación especial del intestino inmediatamente por detrás del píloro, unos apéndices o sacos ciegos denominados ciegos pilóricos, que se consideran dilataciones del intestino ya que histológicamente son similares, pero carecen de células que secretan enzimas digestivas (Vegas-Velez, 1972).

La presencia, ausencia y número de ciegos pilóricos (de 1 a 1000) varía entre especies y con el régimen alimenticio. Algunos autores han correlacionado la capacidad digestiva con el número de apéndices pilóricos (De La Noue, 1989). Entre las funciones relacionadas con los ciegos pilóricos destacan: suplementar la función digestiva del estómago, incrementar la superficie intestinal (puede llegar a ser más del doble que la del intestino) y actuar como reservorio de alimento y lugar de absorción de carbohidratos, grasas, iones inorgánicos y agua (Aoki et al, 2003).

2.4.7 Páncreas, hígado y vesícula biliar

Con la excepción de pocas especies, como el siluro (*Parasilurus asotus*) (Yoshinaka et al., 1984), la mayoría de los teleósteos, al contrario que los vertebrados superiores, poseen un páncreas difuso (Fange y Grove, 1979). En los individuos adultos generalmente está muy ramificado y se localiza a lo largo de la vena porta hepática, así como en las venas que recorren la superficie del estómago, ciegos pilóricos, intestino y bazo (Kurokawa y Suzukil, 1996).

El jugo pancreático, cargado de precursores enzimáticos, se descarga a nivel de los ciegos pilóricos por el esfínter de Oddi a través del ductus pancreaticus,

asociado en algunos peces con el ductus choleducus (jugos biliares) (Bishop y Odense, 1966). El hígado se localiza en la parte anterior de la cavidad abdominal, recibiendo sangre de la arteria hepática y de la vena porta que irriga la mucosa gástrica e intestinal. En la mayoría de los peces la secreción exocrina del hígado, la bilis, se almacena en la vesícula biliar que se comunica con el intestino anterior a través del conducto biliar.

2.5 ONTOGENIA DIGESTIVA DE TOTOABA

Durante los primeros días de vida la larva de tototaba esta se alimenta de manera endógena, debido a que boca y ano se encuentran en proceso de desarrollo y permanece cerrada, por lo que cubre sus requerimientos nutricionales con reservas energéticas destacando aminoácidos y ácidos grasos esenciales que se encuentran en el saco vitelino (Galaviz et al., 2015).

Normalmente la formación de la boca se finaliza al tercer o cuarto día post eclosión (DPH), esto dependerá de los parámetros fisicoquímicos en el que se desarrolle el cultivo larvario (Escárcega, 2021). La formación de la boca ayudará a tragar el alimento vivo disponible para la suplementación externa de los nutrientes necesarios para el mismo desarrollo de las larvas (Galaviz et al., 2015a).

Una vez que la larva comience el cambio de alimentación, es de importancia que las reservas vitelinas no se hayan reabsorbido por completo, ya que estas mismas le serán de utilidad para contar con energía y poder alimentarse de presas vivas (alimentación exógena). En totoaba durante la alimentación exógena el desarrollo del esófago, intestino, páncreas e hígado cuentan con una diferenciación completa de todos los órganos digestivos (Galaviz et al., 2015b).

2.6 MICROBIOTA

La microbiota gastrointestinal se define como un ecosistema microbiano complejo y dinámico que coloniza el tracto digestivo de los organismos (rayo, 2012). Esta

comunidad, compuesta por bacterias, levaduras, virus, arqueos y protozoos, desempeña un papel fundamental en diversas funciones del huésped, ya que favorece el adecuado desarrollo del sistema gastrointestinal, contribuye a la síntesis de vitaminas y a la asimilación de nutrientes mediante actividades enzimáticas, además de optimizar su absorción. Asimismo, participa en procesos de inmunomodulación, lo que resulta de gran relevancia desde el punto de vista nutricional, fisiológico y patológico (Nayak, 2010; Romero et al., 2014).

No obstante la composición y estructura de la microbiota pueden variar en función de la genética del huésped, los hábitos alimenticios, la dieta y las condiciones del medio ambiente. En este contexto, se establece una relación simbiótica entre el huésped y su microbiota intestinal, ya que el primero proporciona un nicho favorable para el crecimiento bacteriano (Serra et al., 2021).

2.7 COMPOSICION Y DIVERSIDAD MICROBIANA EN PECES

El tracto gastrointestinal de las larvas recién eclosionadas tiende a contener pocas bacterias (Ringo et al., 1991). Numerosos estudios han demostrado que la dieta influye en la formación de la comunidad microbiana intestinal por lo que desde la primera alimentación se produce una diversificación sustancial (Blanch et al., 1997; Korsnes et al., 2006; Reid et al., 2009; Lauzon et al., 2010). Parece que la diversidad de bacterias aumenta a medida que los peces se desarrollan (Yatsunenko et al., 2012).

Las proteobacterias son los filos microbianos más destacados que se encuentran en el tracto gastrointestinal de los peces (Rombout et al., 2011). Las proteobacterias, además de bacteroidetes y firmicutes, constituyen el 90% de la microbiota intestinal de los peces de las diferentes especies estudiadas hasta el momento (Ghanbari et al., 2015).

La densidad, composición y función de la microbiota cambian en las diferentes secciones del tracto gastro intestinal (TGI) de los peces (Clements et al., 2014). Además, existe una distinción entre las comunidades alóctonas y autóctonas (Nayak, 2010; Banerjee y Ray, 2017). Las alóctonas son la microbiota transitoria de

vida libre asociada a la ingesta, mientras que la microbiota autóctona coloniza la superficie mucosa del tracto digestivo y constituye la comunidad central. La densidad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas viables suele oscilar entre 10^4 y 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) g^{-1} de contenido intestinal, respectivamente (Skrodenytė y Arbaiauskienė, 2007).

La microbiota autóctona puede diferir en particular, teniendo en cuenta la variación de los entornos fisiológicos entre las diferentes partes del tracto digestivo (Clements et al., 2014a). El estómago a menudo se omite de los análisis de composición microbiana intestinal.

Vibrio, un género diverso del filo Proteobacteria, es uno de los géneros bacterianos más importantes en la acuicultura, con especies patógenas y probióticas (promotoras de la salud) (Vandenberghe et al., 2003). *V. anguillarum*, *V. salmonicida* y *V. vulnificus* se encuentran entre los principales patógenos bacterianos de las especies de peces e invertebrados marinos (Austin y Austin, 1999). Los *vibrios* patógenos comúnmente infectan a las larvas y pueden causar muertes repentinas y significativas.

Sin embargo, se ha planteado la hipótesis de que muchas especies de *Vibrio* no son verdaderos patógenos, sino patógenos oportunistas cuya virulencia se acentúa en condiciones de acuicultura intensiva muchas especies de *Vibrio* producen enzimas hidrolíticas y, de esta manera, pueden actuar como simbiosiontes, ayudando en la descomposición de los componentes de la dieta. Se ha encontrado que las cepas producen amilasa (Hamid et al., 1979; Gatesoupe et al., 1997), lipasa (Gatesoupe et al., 1997; Henderson y Millar, 1998), celulosa (Itoi et al., 2006; Sugita e Ito, 2006) y quitinasa (MacDonald et al., 1986) entre otros (Ray et al., 2012).

Photobacterium es también un género del filo Proteobacteria y de la familia Vibrionaceae. Esta bacteria luminosa se encuentra comúnmente en la superficie de los peces sanos y originalmente se asoció con órganos emisores de luz, por ejemplo, *Photobacterium angustum*, *P. leiognathi* y *P. phosphoreum* (Cahill, 1990). Muchas *Photobacterium* actúan como bacterias mutualistas en el intestino del huésped ayudando con la digestión de la quitina (MacDonald et al., 1986; Ramesh

y Venugopalan, 1989; Itoi et al., 2006). Sin embargo, algunos también producen enzimas dañinas como las neuraminidasas (Sugita et al., 2000). *Photobacterium damselae* es un productor de neuraminidasas y es un patógeno común para peces silvestres y cautivos (Romalde, 2002). Hay dos subespecies de *P. damselae*; *P. damselae* ssp. *damselae* y *P. damselae* ssp. *piscicida*. El primero se asocia con úlceras cutáneas, mientras que el segundo es el agente infeccioso de la pasteurellosis en peces (Urbanczyk et al., 2011).

Clostridium es un género muy común dentro del filo Firmicutes. Es un anaerobio Gram-positivo obligatorio con muchas especies patógenas. *Clostridium difficile* es una especie comúnmente conocida de este género, ya que se asocia con enfermedades diarreicas en humanos y animales (Metcalf et al., 2011). Sin embargo, no se ha asociado ampliamente con los peces marinos, aunque los estudios que investigan *C. difficile* en los peces son limitados. Se llevó a cabo un estudio en el cual no se encontró la presencia de *C. difficile* en 107 contenidos intestinales de peces marinos y de agua dulce (Al Saif y Brazier, 1996)

Clostridium botulinum es una especie patógena y frecuentemente se asocia a los peces marinos. Los peces son susceptibles al tipo E y ocasionalmente al B (Mazuet et al., 2016; Uzal et al., 2016).

Las especies de *Clostridium* a menudo funcionan como simbioses mutualistas con huéspedes marinos, especialmente peces herbívoros (Clements et al., 2007, 2009). Se ha demostrado que contribuyen a la nutrición del huésped, especialmente mediante el aporte de ácidos grasos y vitaminas (Balcázar et al., 2006). En la platija del sur (*Paralichthys lethostigma*), *Clostridium* junto con otros géneros gramnegativos mostraron actividades enzimáticas de fosfatasa ácida y alcalina, esterasas C4 y C8, lipasas C14, arilamidasa y glicosidasas (Ramírez y Dixon, 2003).

Más allá de esta simbiosis natural, algunas especies de *Clostridium*, como la bacteria butírica o clostridio butírico (*C. butyricum*), se han utilizado con éxito como probiótico en la acuicultura, mejorando la resistencia de la trucha arco iris a la

vibriosis (Sakai et al., 1995) y estimulando la respuesta inmune y mejorando la supervivencia en la platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*) (Taoka et al., 2006).

En general, dentro del medio marino, Proteobacterias, en lugar de Firmicutes, suele ser el filo dominante en los niveles tróficos no herbívoros (Miyake et al., 2015). Vibrionaceae, Aeromonas y Pseudomonas se reportan frecuentemente en carnívoros, omnívoros y (zoo-) planctívoros.

2.8 EFECTO TÉRMICO EN LA MICROBIOTA

En organismos poiquiloterms como los peces, la temperatura del agua influye en la salud y el rendimiento del crecimiento (Steiner, 2022). Cuando los peces se exponen a altas temperaturas, activan los sistemas antioxidantes y de defensa innata, esto les permite resistir el estrés a altas temperaturas alterando la expresión génica y los procesos metabólicos (Fang, 2023).

La temperatura es un factor que afecta el metabolismo de los peces (Dowd et al., 2006, Pirozzi y Booth, 2009; Clark et al., 2013; Schulte, 2015; Enders y Boisclair, 2016); Las fluctuaciones en la temperatura diaria o estacional influyen en el costo metabólico de la movilización del flujo sanguíneo al intestino, la secreción de enzimas para la digestión y el costo post-absorción de la asimilación (Secor, 2009; Tirsgaard et al., 2015; Chabot et al., 2016). Además del costo energético, el tiempo de tránsito intestinal y la tasa de digestión podrían disminuir o aumentar en función de la temperatura ambiental (Miegel et al., 2010). En este sentido, el tiempo de tránsito intestinal modificado por la temperatura ambiental puede influir en la microbiota intestinal, en el estado de salud e incluso en el crecimiento de los peces (Larios et al., 2021).

2.9 GEN 16S rRNA

El gen diana o Gen del ácido ribonucleico (ARN) ribosómico 16s (rRNA) es uno de los genes empleados para la identificación bacteriana, así como también diversas

poblaciones bacterianas de varios huéspedes, como algas, moluscos, crustáceos y peces. (Srinivasan et al., 2015; Pérez, 2024).

A causa de que está altamente conservado en células procariotas (bacterias y arqueas), y es posible encontrarlo en todos los genomas mitocondriales (Wang y Qian, 2009). La estructura del gen 16s (rRNA) ha persistido a lo largo del tiempo por lo que lo convierte en un marcador genético (Janda, 2007). Debido a que tiene diez regiones altamente conservadas, es utilizado eficazmente para diseñar cebadores universales, esto permite la identificación de una variabilidad de taxones bacterianos, incluidas aquellas bacterias desconocidas, y la identificación precisa de especies particulares (Clarridge, 2004).

III. ANTECEDENTES

Recientemente, Li (2024) investigó los efectos de la baja temperatura sobre los indicadores bioquímicos séricos, el microbioma intestinal y el transcriptoma en el pámpano dorado juvenil (*Trachinotus ovatus*). Aunque no se observan cambios significativos en la riqueza y diversidad de la flora intestinal, la composición de la flora dominante es alterada. Los resultados de la secuenciación del transcriptoma del tracto intestinal revelan que los genes expresados diferencialmente bajo estrés por baja temperatura están involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y el metabolismo de la arginina y la prolina, lo que sugiere una respuesta metabólica sensible a las rápidas caídas de temperatura del agua.

Yang (2022), estudio el impacto del estrés térmico sobre la estructura y función del intestino, así como las características de la microbiota intestinal en esturiones (*Acipenseridae*). Los resultados demuestran que el estrés térmico causa un trastorno en la microbiota intestinal, con un aumento significativo en la abundancia de patógenos termófilos como *Plesiomonas*, *Cetobacterium* y *Aeromonas*, lo que resulta en una disfunción fisiológica.

Wong et al., (2022) señalaron que la temperatura ambiente afecta la radiosensibilidad del pez cebra al influir en la microbiota intestinal. Así mismo los diferentes niveles de temperatura ambiental estructuran configuraciones específicas de la microbiota intestinal, incrementando la abundancia de bacterias grampositivas a través de la adición de prebióticos o algunas bacterias grampositivas potenciales.

Larios et al., (2021) analizaron el efecto de la temperatura de aclimatación (20 y 26° C) sobre el rendimiento metabólico y fisiológico del pez rey de cola amarilla (*Seriola lalandi*). De tal forma que el estudio mostró que los juveniles presentan un marcado comportamiento de termorregulación, ya que seleccionan activamente la temperatura del ambiente que les permite optimizar su eficiencia metabólica lo que sugiere que la temperatura podría influir en el metabolismo y crecimiento.

Luijwa et al., (2021) describen que el estrés térmico a temperaturas de 19 - 20° C en el agua del mar tiene efectos significativos sobre la fisiología del salmón real (*O. tshawytscha*), incluyendo la mortalidad y la pérdida de peso.

Volkoff y Ronnestad (2020), estudiaron el impacto de la temperatura en los ectotermos como los peces, demostrando que la temperatura afecta las reacciones bioquímicas, por lo tanto, los procesos fisiológicos y crecimiento.

Rastall (2004), hizo una contribución importante en su campo de estudio al demostrar la relevancia de *Escherichia coli* en el tracto gastrointestinal humano, sentando las bases para el estudio de la microbiota gastrointestinal en otras especies.

La primera observación sobre la presencia de microorganismos gastro intestinales (GI) en cualquier huésped fue realizada por Leewenhock en 1674 (Dobel, 1932)

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la microbiota de totoaba (*T. macdonaldi*) durante su desarrollo larval.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el crecimiento de larvas de totoaba (*T. macdonaldi*) cultivadas a diferentes temperaturas (20, 24, 26 y 28° C).
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la microbiota de *T. macdonaldi* durante las primeras etapas larvales, a través del análisis del gen 16S rRNA.

4.3 HIPOTESIS

Las variaciones térmicas pueden inducir cambios significativos en el crecimiento y sobrevivencia en larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) lo que, a su vez, puede influir en la estructura de la microbiota.

V. MATERIALES Y METODOS

6.1 OBTENCION DE LARVAS

Los huevos fecundados de totoaba se obtuvieron de un lote de reproductores que se mantiene cautiverio en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada.

La inducción al desove y el manejo de larva se realizó de acuerdo con lo reportado por True (2012) y Galaviz et al. (2015) después del desove los huevos fertilizados (los que flotaban) se colectaron 28-36 horas (h) después del desove y se trataron con formol 100 PPM durante 1 h, se enjuagaron y se almacenaron a una densidad de 100 huevos L-1 en tanques de fondo cónico de 2200 L con agua de mar a una temperatura de (proceso aclimatación) 20° C, los estanques se encontraban conectados a un sistema de recirculación a una velocidad de 1.5-2 L min-1 a través de un biofiltro de lecho fluidizado, un esterilizador UV y un fraccionador de espuma. Los huevos eclosionaron aproximadamente 20 h después de la incubación. Para facilitar la separación, se aumentó la densidad del agua de mar. Para estimar el número de huevos viables, se tomaron varias muestras de un mililitro y se cuantificaron con el microscopio estereoscópico Axiostar plus (Zeiss, Oberkochen, German), con el objetivo de 5x y se contabilizaron de acuerdo con el método descrito por (Kjorsvik et al. 1990).



Figura 2 Área de larvario en unidad de Biotecnología de piscicultura

6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Tras la eclosión, las larvas de totoaba se colocaron a una densidad de 150 individuos L^{-1} en un sistema compuesto por cuatro tratamientos (20, 24, 26 y 28° C) por triplicado, asignados de forma aleatoria. Se utilizaron 12 tanques cónicos de fibra de vidrio de 100 litros de capacidad (Figura 2), conectados a un sistema de recirculación de agua compuesto por un filtro biológico y otro mecánico, una bomba de 1/2 caballo de potencia (CV) y luz ultravioleta para mantener la calidad del agua y una temperatura adecuada para el cultivo.

Los tanques de experimentación se limpiaron diariamente (fondos y organismos muertos) con la ayuda de un sifón de PVC con esponja para retirar los desechos orgánicos que se mantuvieron adheridos a las paredes del tanque. La temperatura del agua se mantuvo a través de calentadores con capacidad de 300 y 500 W, el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto se determinó por medio de un equipo (YSI) (ProQuatro) durante todo el periodo experimental.

6.3 PROTOCOLO DE ALIMENTACIÓN

Siguiendo el protocolo de alimentación propuesto por Galaviz et al., (2015), se administraron tres alimentaciones diarias. La alimentación exógena se inició una

vez que el saco vitelino y la gota de aceite fueron completamente absorbidos, lo cual ocurrió entre los tres y cuatro días post eclosión (DPH).

La alimentación se basó en rotíferos (*Brachionus plicatilis*) enriquecidos con ácidos grasos de 4 a 10 DPH. Posteriormente de 10 a 16 DPH y de 16 a 24 DPH con metanauplios de *Artemia* enriquecidos y microdieta (Otohime B 250-360 mm, proteínas 52,1%, lípidos 16,3%, cenizas 11,2%). Las larvas fueron alimentadas tres veces por día (8:00, 13:00, 16:00 hrs) la alimentación se realizó con el método *ad libitum*.

6.4 CRECIMIENTO

Para cada día de muestreo (7 y 24 DPH), se tomaron larvas para obtener la longitud y peso de cada tanque. El procedimiento consistió en tomar 15 larvas por tanque (08:00 horas; condición de ayuno), pesarlas en una balanza (Sartorius AG CP224S, Alemania) y medirlas en un microscopio (MEIJI EMZ-13TRH, Japón), que se superpusieron en una cámara Neubauer. Se capturó una imagen con el programa ImageJ v1.53j y se midió la longitud exacta de cada larva.

6.5 TOMA DE MUESTRA PARA METAGENOMICA

Para el muestreo de metagenómica, las larvas (N= 15) de cada tanque fueron sacrificadas mediante una sobredosis de anestesia (Tricaine methanesulfonate-MS 222), colocándolas en agua saturada con etanol 1:1 70% - eugenol (E51791 SigmaAldrich, U.S.A.), luego enjuagadas con agua destilada. Esta investigación se realizó con el procedimiento estándar de UABC (manejo animal) NDGVS-CR-IN-1084BC/09 SEMARNAT, este procedimiento estándar cumple con la guía de la unión Europea (2010/63/EU) y la guía del gobierno mexicano (NOM-062-ZOO-1999).

6.6 EXTRACCIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN

Se realizó la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico a partir de un pool de larvas por tratamiento, por triplicado, utilizando el método de bromuro de centiltrimetilamonio (CTAB) en combinación con disrupción mecánica con perlas de zirconia (Sigma- Aldrich).

Para la lisis celular se pesó 50 mg de muestra, para después resuspender en 300 µl de buffer CTAB, se añadió 100 mg de perlas de zirconia, 10 µl de lisozima (Merck KGaA) y 20 µl de proteinasa K, para finalmente incubar por dos horas a 55° C agitando cada 10 min con vortex.

Posteriormente para la extracción de DNA se agregaron 300 µl de cloruro de litio a 5 M (LiCl) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 minuto, se añadieron 300 µl de cloroformo:isoamílico para favorecer la separación de los ácidos nucleicos e incubar nuevamente a temperatura ambiente por 30 minutos, mezclando cada 5 minutos, finalmente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos para poder extraer la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo.

Finalmente, para el proceso de precipitación, se agregó 50 µl de acetato de sodio a 3 M. Para la interface y fase orgánica se adiciono 700 µl de etanol absoluto, para posteriormente incubar toda la noche a -20° C. Al día siguiente se centrifugo a 4° C a 12,000 rpm durante 10 minutos, mediante la técnica de decantación se retiró el sobrenadante, para añadir 400 µl de etanol al 75% al pellet resultante, después se centrifugo a 13,000 rpm por 5 minutos a 4° C, se descartó nuevamente el sobrenadante para dejar secar el pellet obtenido dentro de la campana de flujo laminar durante al menos 30 minutos, se resuspendió con 50 o 100 µl de agua milliQ.

Una vez se obtuvieron las muestras, se almacenaron a -20° C. Para después amplificar las regiones V3-V4 del gen 16S con cebadores específicos en el laboratorio de genómica bacteriana del CIAD Mazatlán.

6.7 PROCESAMIENTO DE SECUENCIAS

El pipeline fue elaborado en el laboratorio de microbiología genómica del CIAD, Mazatlán ([https://github.com/ GenomicaMicrob/metagenomic_pipeline](https://github.com/GenomicaMicrob/metagenomic_pipeline)), el cual consta de los siguientes pasos: Para Análisis de los datos de secuenciación, se realizó mediante diferentes herramientas como pair-end_cleaner v.0.9 y CUTADAPT (Martin, 2011) para eliminar adaptadores de secuenciación y lecturas con un nivel de calidad $Q < 20$, lecturas con secuencias ambiguas y reads demasiado cortos < 140 pb. El ensamble se realizó con PEAR, las secuencias quiméricas fueron removidas con Chimera-detector v.0.1.1. Para comprar las secuencias se realizó con la de datos de EzBioCloud a través de Vsearch (Rognes et al., 2016). Posteriormente, las secuencias se clasificaron mediante script de mgclassifier v.1.7.0. Por ultimo las secuencias fueron agrupadas con un 97% de similitud con Vsearch, y se realizó la clasificación por pareo con la base de datos de EzBioCloud (Yoon et al., 2017).

6.8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Posteriormente se realizó un filtrado de muestras para trabajar únicamente con las variables de temperatura 20, 26, 28° C y los DPH 7 y 24.

Una vez que se revisaron los estándares de calidad del ADN, las muestras fueron enviadas al laboratorio de genómica bacteriana del CIAD Mazatlán para la secuenciación de la región v3 del gen 16s ARNr a través de la tecnología de Illumina. Después de la secuenciación, se obtuvieron 42 archivos en formato fastq los cuales correspondieron a las secuencias de cada muestra.

Las secuencias se procesaron en el servidor del Laboratorio de Genómica Microbiana, CIAD AC con las herramientas de *chimera_detector* v1.5.1 y *mg_classifier* v2.1.0. Se utilizó mediante (*paired-end_cliner*), CUTADAPT v2.8 para eliminar las bases con baja calidad ($< Q30$), las secuencias no asignadas ("N") y las secuencias muy cortas (< 110 bases). Después de la limpieza, se utilizó *PEAR*

v0.9.8 para realizar el ensamble de las secuencias con un mínimo del largo de 170 bases y un máximo de 250 para la región 16S-V3.

Después del proceso del ensamble, fue necesario revisar dicho ensamble en busca de secuencias chimericas las cuales son secuencias mal ensambladas. Para ello, se utilizó la herramienta *chimera_detector v1.5.1*. Esta herramienta utiliza la base de datos de SILVA 138.1 con la finalidad de comparar las secuencias obtenidas y detectar secuencias erróneas, para ello compara las secuencias y las clasifica en chimericas o no chimericas con un grado de 97% de similaridad.

Finalmente se realizó la clasificación de las secuencias con la ayuda de *mg_classifier v2.1.0* el cual utiliza la base de datos de EzBioCloud-LGM v18072024.v2 para ello, las secuencias son clasificadas con un porcentaje de similitud del 97%. Las secuencias son clasificadas en OTUs con la siguiente nomenclatura: domain; phylum; class; order; family; genus; species.

6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis de homocedasticidad y normalidad se realizó a través del software Zigma Plot v12.0 dando un nivel de significancia de $p < 0.05$ para los datos de longitud y peso.

En el análisis de los datos de longitud se determinó que no cumplen con igualdad de varianza por lo que se aplicó un análisis de kruskal- wallis y el método de Dunn's (análisis post hoc). Por otro lado, los análisis de los datos de peso presentaron normalidad e igualdad de varianza por lo que se pudo aplicar la anova de una vía. En estos datos se aplicó el método de holm sidak o bonferroni (análisis post hoc).

Para los índices de diversidad alpha (Shannon, Observed_OTUs) así como los gráficos correspondientes se desarrollaron con el pipeline de QIIME2 (v2019.7) a través de una máquina virtual (VirtualBox). El análisis de diversidad dentro de la muestra (Alpha) se calcularon con el comando *qiime diversity core-metricsphylogenetic*, este comando genera los cálculos de los diferentes índices de

diversidad y genera los gráficos en formato boxplot (para los índices alpha) o análisis de componentes principales (para los índices beta). Por otro lado, los principales OTUs encontrados fueron graficados en EXCEL y se representaron en graficas de abundancia relativa.

VI. RESULTADOS

7.1 CRECIMIENTO

Se muestra el peso final promedio ($\pm$ error estándar) de los organismos expuestos a tres diferentes temperaturas: 20, 26 y 28° C. Se observa que el mayor peso final se registró a 26° C (0.078 ± 0.02 g), seguido por 28°C (0.047 ± 0.006 g), mientras que el peso más bajo se obtuvo a 20° C (0.016 ± 0.001 g). El error estándar fue más alto en el grupo de 26° C, indicando una mayor variabilidad en los datos. Estos resultados sugieren que la temperatura influye en el peso final, siendo 26° C la condición que promovió un mayor crecimiento.

En cuanto a la longitud final promedio ($\pm$ error estándar) de los organismos sometidos a tres temperaturas diferentes: 20, 26 y 28° C. La mayor longitud final se observó a 26° C (2.03 ± 0.27 cm), seguida por 28°C (1.85 ± 0.07 cm) y finalmente por 20° C (1.11 ± 0.4 cm). La variabilidad fue más alta en el grupo de 20° C, como lo indica su error estándar más amplio. Estos resultados indican que la longitud es afectada por la temperatura, siendo 26° C la condición óptima para el crecimiento en longitud.

Los resultados obtenidos indican que la temperatura tiene un efecto marcado sobre el crecimiento, tanto en peso como en longitud, de los organismos estudiados. Este patrón sugiere que la temperatura de 26° C se encuentra dentro del rango óptimo fisiológico para la *T. macdonaldi*, promoviendo una mayor eficiencia en procesos metabólicos asociados al crecimiento.

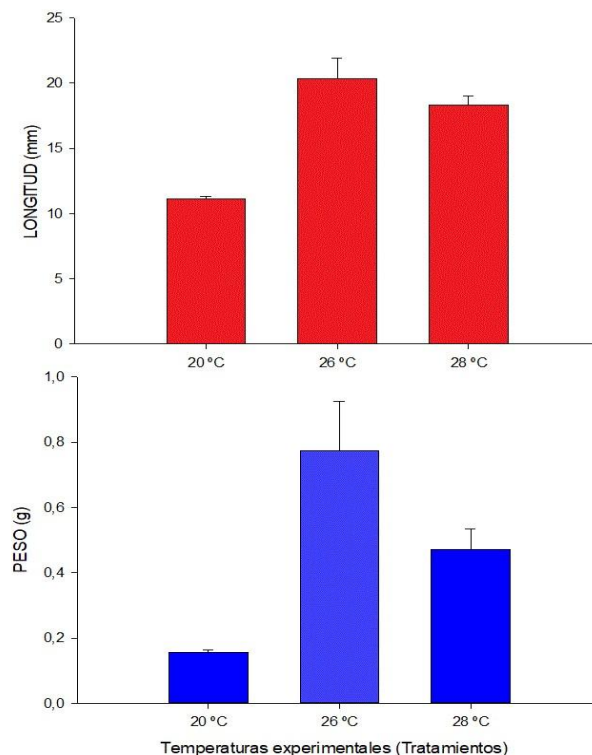


Figura 3 Graficas de peso y longitud, correspondientes a las temperaturas experimentales (20, 26, 28° C

7.2 ANALISIS DEL GEN 16S ARNr

Tras la secuenciación de 42 muestras de la región V3-V4 del gen 16s ARNr se obtuvieron un total de 1 919 172 secuencias en formato *fastq*. Después de la limpieza de secuencias se obtuvieron 874 470 secuencias de alta calidad. Las 874 470 secuencias que fueron evaluadas con *chimera_detector*, 494 332 pudieron ser secuencias *quiméricas* (57%) las cuales fueron eliminadas. El resto de las secuencias de buena calidad y libres de quimeras fueron solo 380 138 las cuales fueron clasificadas con la herramienta “*mg_classifier* v2.1.0”, para ello se utilizó la base de datos EzBioCloud-LGM v18072024.v2. Se clasificaron las secuencias en 1 884 bacterias de las cuales se encontraron 25 Phylums, 331 Familias, 767 Géneros.

La evaluación de la profundidad de secuenciación, en términos de riqueza y abundancia de secuencias, se realizó para cada muestra con el fin de determinar la profundidad de muestreo donde 30 muestras presentaron un número de secuencias superior a 15 000 (en un rango de

15 000 a 36 000 secuencias) (Figura 5). Por otro lado, 12 muestras mostraron menos de 15 000 secuencias ensambladas, de las cuales 5 muestras contenían menos de 5 000 secuencias.

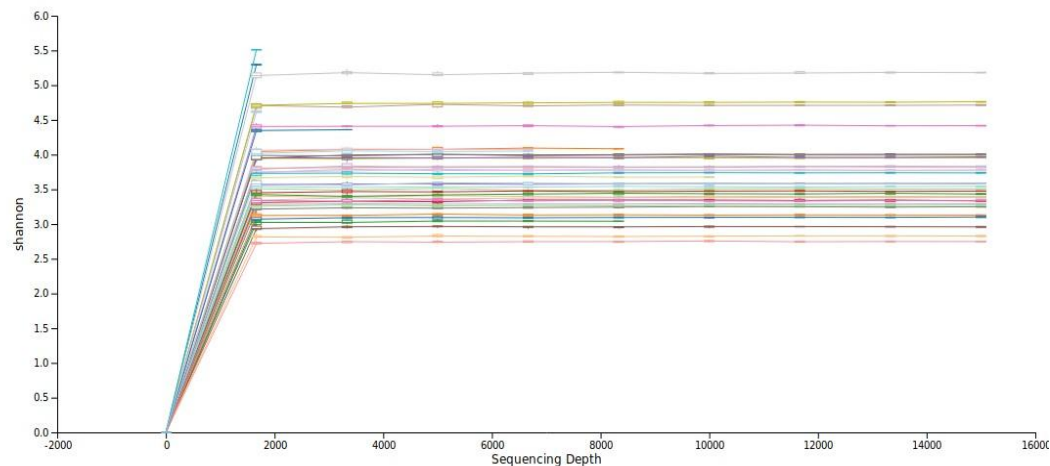


Figura 4 Análisis de profundidad de secuenciación

El eje de las Y representa los valores del índice de Shannon (Biodiversidad específica) y el eje de las X representa la abundancia de secuencias o la profundidad de secuenciación. Cada línea de color representa una de las 42 muestras analizadas.

Los resultados del análisis revelaron el número de OTUS observados; durante los días 7 y 24 DPH, observándose una dominancia del phylum Pseudomonadota con un 96.53% seguido de los phylums Bacillota y Bacteroidota con un 3.46% de la abundancia relativa total.

A partir de la base de datos de secuenciación (gen ARNr 16S), se identificaron las 15 familias (Figura 5) asociadas a los tres principales phylums (Pseudomonadota, Bacillos y Bacteriodetes) en las larvas de totoaba durante los primeros 24 días DPH.

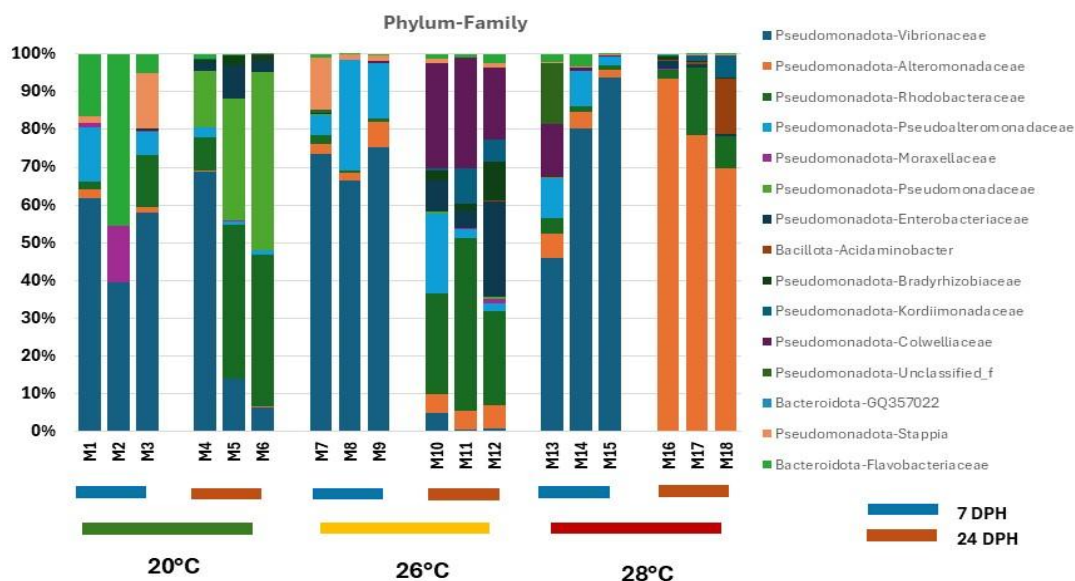


Figura 5 Principales 15 familias asociadas a las temperaturas (20, 26, 28° C) de larvas de *T. macdonaldi*. Días post eclosión (DPH), M (Numero de muestras)

En particular, los tratamientos DPH 7 mostraron una clara dominancia de la familia *Vibrionaceae*, representando más del 70% de la comunidad bacteriana en estas muestras. Por otro lado, los tratamientos DPH 24 de 20 y 26° C presentaron una alta proporción de *Rhodobacteraceae*, mientras que el tratamiento DPH 24 a 28° C estuvo dominada por *Alteromonadaceae*.

El tratamiento DPH 24 de 26° C mostró una mayor abundancia de familias bacterianas, con proporciones más distribuidas entre varios taxones, incluyendo *Pseudoalteromonadaceae*, *Colwelliaceae*, *Enterobacteriaceae* y otras. Además de las familias como *Stappiaceae*, *Flavobacteriaceae* y *Acidaminobacter*, estuvieron presentes en proporciones menores.

Finalmente, el tratamiento DPH 24 a 28° C evidenció una dominancia marcada por *Alteromonadaceae* y *Stappiaceae*, indicando un posible cambio en la composición microbiana en estas últimas muestras.

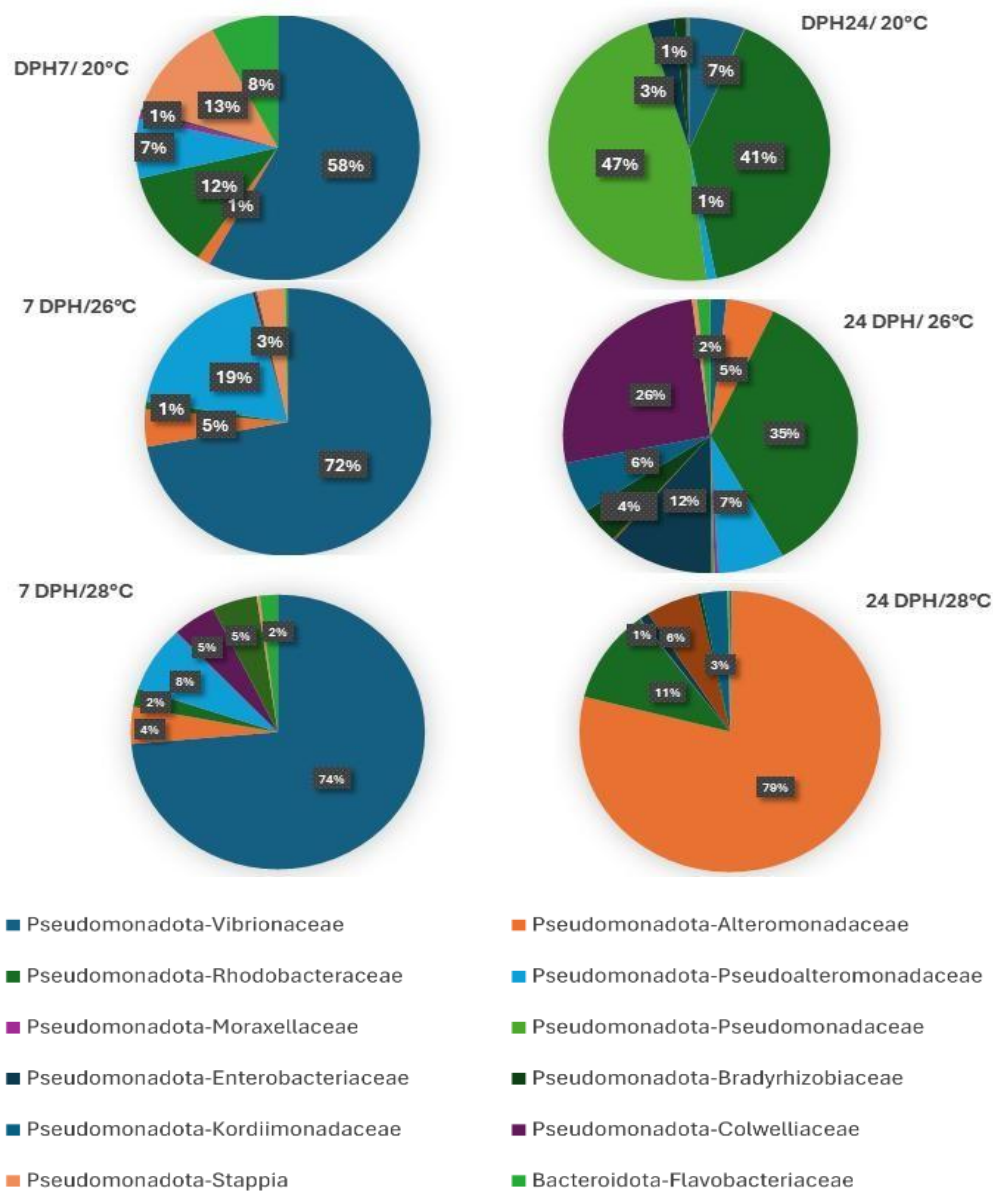


Figura 6 Tendencias sobre las temperaturas (20,26, 28° C) en DPH 7 y 24

Las variaciones de temperatura mostraron cambios en la diversidad de la microbiota en las larvas de totoaba, de acuerdo con las tendencias observadas (Figura 7). A los 7 DPH, las larvas cultivadas a 20° C presentaron una mayor abundancia de la familia Vibrionaceae, con un 56%; no obstante, a los 24 DPH, las familias predominantes fueron Pseudomonadaceae y Rhodobacteraceae, con un 47% y un 41%, respectivamente. Por otro lado, a los 7 DPH a 26° C la familia Vibrionaceae continuó siendo la más abundante con un 77%, Sin embargo, a los 24 DPH, se observó una mayor diversidad destacando las familias Rhodobacteraceae (35%), Colwelliaceae (26%) y Enterobacteriaceae (12%) como las más dominantes.

Finalmente, a los 28° C, la familia Vibrionaceae siguió siendo predominante, con un 74%; y de tal modo que a 24 DPH, se observó un cambio en la microbiota, con la familia Alteromonadaceae alcanzando un 79%.

Se calcularon los índices de diversidad alfa Observed_OTUs y el índice de Shannon. Los índices se calcularon tomando como referencia de agrupación los tratamientos a distintas temperaturas. Se muestra la riqueza observada (Figura 8) de unidades taxonómicas operativas (OTUs) en diferentes grupos definidos por el tratamiento y DPH etiquetados en el eje X

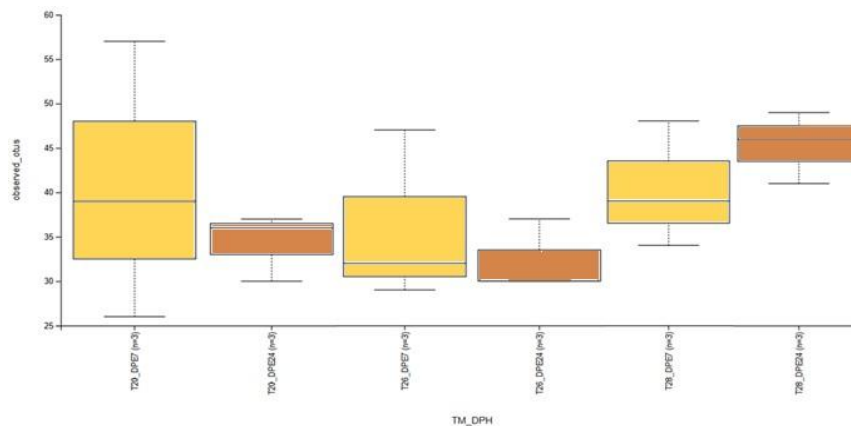


Figura7 Índices de OTUs observados alfa según la temperatura de las larvas de Totoaba macdonaldi. T (tratamientos), n (número de muestras).

Se observaron las siguientes tendencias, donde T20 a DPH 7 muestra una variabilidad en la riqueza observada con una mediana cercana a 45 OTUs, siendo el tratamiento con mayor dispersión.

Sin embargo, T28 a DPH 24 es el grupo con mayor riqueza observada que presenta un valor con una mediana alrededor de 45-47 OTUs y valores máximos cercanos a 50.

Con respecto a T20 y T26 a DPH 24 no hubo diferencias significativas presentan una riqueza más homogénea, con menor dispersión, donde T20 se observa con una mediana cercana a 36 OTUs y T26 una mediana cercana a 30 OTUs.

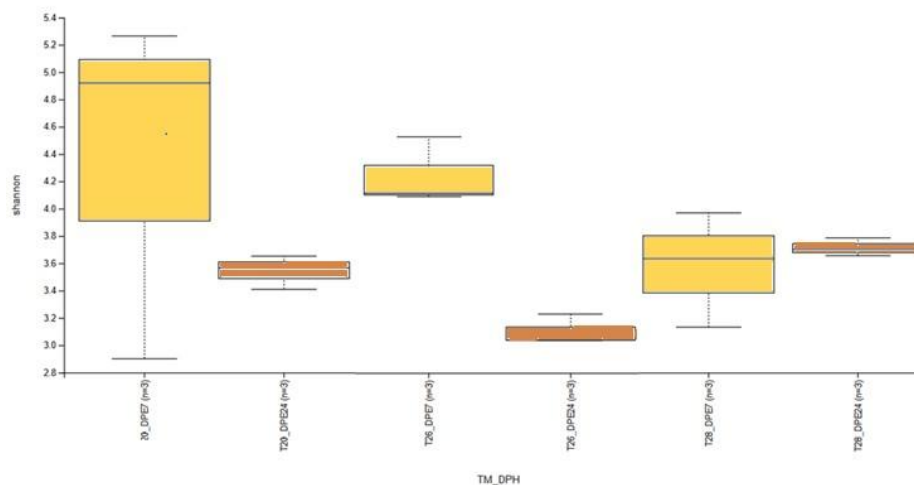


Figura 8 Índice de Shannon.D (diversidad), T (tratamiento).

A diferencia del análisis de OTUs observados, los resultados del análisis de diversidad de Shannon presentaron las siguientes tendencias: A los DPH 7 se observó una disminución en la tendencia con el aumento de la temperatura (de 20 a 28° C) de 5.9 a 3.7 respectivamente, sin embargo, a los 24 DPH una variabilidad en la tendencia con respecto a las temperaturas donde T26 obtuvo el valor más bajo de 3.3, siendo T28 el tratamiento con la diversidad más alta del 3.7.

VII. DISCUSIÓN

Este estudio documentó el efecto de la temperatura sobre la microbiota de *T. macdonaldi* mantenido en diferentes regímenes de temperatura en condiciones experimentales controladas.

Los cambios observados en la microbiota en relación con el crecimiento de los organismos respaldan la hipótesis planteada y evidencian una estrecha interacción entre la temperatura, el desempeño fisiológico y la estructura de las comunidades microbianas intestinales. Estas observaciones se alinean con investigaciones previas que han demostrado que el estrés térmico tiene efectos significativos sobre la fisiología de los peces, particularmente durante las etapas tempranas del desarrollo

Estudios recientes han señalado que la temperatura puede modificar la composición de la microbiota intestinal sin necesariamente afectar su riqueza o diversidad. De acuerdo con Li (2024) reporto que, en juveniles de *Trachinotus ovatus*, la exposición a bajas temperaturas no generó cambios significativos en la diversidad microbiana, pero si altero la composición de la flora dominante. Además, el análisis transcriptómico reveló que los genes diferencialmente expresados bajo estrés térmico estaban relacionados con la biosíntesis de aminoácidos y el metabolismo de arginina y prolina, lo que sugiere una respuesta metabólica sensible a las variaciones térmicas. De manera consistente, los resultados del presente estudio muestran que, en las larvas de *T. macdonaldi*, la temperatura influye tanto en la composición y diversidad de la microbiota intestinal como en el crecimiento, lo que indica que en las etapas tempranas de desarrollo podrían ser particularmente vulnerables a los cambios térmicos.

Asimismo, Yang (2022) demostró que el estrés térmico provoca alteraciones significativas en la estructura y función intestinal de esturiones, caracterizadas por un aumento en la abundancia de patógenos termófilos como *Plesiomonas*, *Cetobacterium*, y *Aeromonas*, lo que conduce a disfunciones fisiológicas. Aun que en el presente estudio no se evaluó directamente la patogenicidad bacteriana, los cambios observados en la microbiota intestinal de *T. macdonaldi* sugiere que la

temperatura puede inducir desequilibrios microbianos (disbiosis) con potencial impacto sobre la salud y el crecimiento larval

Desde una perspectiva fisiológica, Larios et al., (2021) demostraron que juveniles de *Seriola lalandi* exhiben un comportamiento activo de termorregulación, seleccionando temperaturas que optimizan su eficiencia metabólica. De igual manera, Luijwa et al., (2021) reportaron que el estrés térmico en salmón real provoca efectos adversos como pérdida de peso y aumento de la mortalidad.

En este contexto el presente estudio aporta evidencia adicional al demostrar que en larvas de *T. macdonaldi*, la temperatura no solo modula el crecimiento y desarrollo, sino que también desempeña un papel fundamental en la composición y diversidad de la microbiota intestinal.

En términos de crecimiento la temperatura de 26° C fue la más favorable, ya que obtuvo los valores promedios más altos de peso y longitud finales, esto sugiere que esta condición térmica se encuentra dentro del rango óptimo fisiológico para el desarrollo larval. En contraste a 20° C se observó un menor crecimiento, probablemente asociado a una baja en el metabolismo, mientras que a 28° C se presentó un crecimiento intermedio que podría derivarse al estrés térmico el cual fue una delimitante en el desarrollo.

Estos patrones de crecimiento mostraron una estrecha relación con los cambios observados por la temperatura y el tiempo DPH sobre la microbiota intestinal.

La microbiota que habita principalmente en el tracto gastrointestinal de los peces marinos constituye un complejo conjunto de microorganismos, incluyendo bacterias, arqueas, hongos, virus, protozoos y otros microbios (Ou et al., 2021). Estas comunidades microbianas desempeñan funciones clave en la digestión, la modulación del sistema inmunológico, la protección frente a patógenos y la adaptación a las condiciones ambientales (Rawls, 2007).

Estudios recientes han señalado que los microbios intestinales predominantes en peces marinos son, en su mayoría, anaerobios facultativos, entre los que se incluyen géneros como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Alteromonas*, *Flavobacterium* y *Micrococcus*. En este contexto, el

filo Proteobacteria suele dominar en el intestino de peces marinos carnívoros (Egerton et al., 2018).

Diversos factores pueden influir en la composición de la microbiota, como la dieta, la temperatura, la salinidad y el estrés ambiental. Cuando estos factores se mantienen dentro de rangos normales, la microbiota intestinal contribuye al equilibrio del organismo (homeostasis). Sin embargo, la alteración de alguno de ellos puede provocar un desequilibrio microbiano o disbiosis, lo que aumenta la susceptibilidad del pez a enfermedades e influye negativamente en su crecimiento y desarrollo (Ou et al., 2021a).

En particular, los tratamientos a 7 DPH, mostraron una clara dominancia de la familia *Vibrionaceae*, superando el 70% de la comunidad bacteriana en todos los tratamientos. Esta familia es comúnmente reportada como dominante en las primeras etapas larvales de peces marinos, posiblemente debido a su rápida capacidad de colonización y adaptación a ambientes ricos en nutrientes generados por la actividad metabólica larval (Romero et al., 2014).

En el caso del tratamiento a 26° C, la presencia de *Vibrionaceae* alcanzo el 77% a los 7 DPH, lo cual sugiere que esta temperatura favorece el crecimiento de este grupo bacteriano en estas etapas iniciales. Sin embargo, a los 24 DPH se observó una sucesión significativa en la composición microbiana, caracterizada por una disminución relativa de *Vibrionaceae* y un aumento de la diversidad bacteriana. Por ejemplo, en el tratamiento a 20° C, las familias predominantes fueron, *Pseudomonadaceae* (47%) y *Rhodobacteraceae* (41%), mientras que a 26° C se observó una comunidad con una mayor distribución entre varias familias, incluyendo *Colwelliaceae* (26%), *Enterobacteriaceae* (12%) y *Rhodobacteraceae* (35%), lo que podría estar asociado a una microbiota más funcional conforme al desarrollo larval debido a los requerimientos fisiológicos, el cual es consistente con el buen desempeño en el crecimiento observado a esta temperatura. A 20° C, aunque el microbiota también mostró diversidad, las condiciones subóptimas probablemente limitaron tanto la actividad microbiana beneficiosa como el crecimiento. En cambio, a 28° C se observó una tendencia, donde, a los 24 DPH, las muestras estuvieron dominadas por *Alteromonadaceae* (79%) y, en menor proporción, *Stappiaceae*,

indicando un cambio marcado en la comunidad microbiana en condiciones de mayor temperatura. Esta dominancia puede ser el resultado de un estrés térmico que favorece la proliferación de bacterias más tolerantes o adaptadas a temperaturas elevadas (Schryver y Vadstein, 2014), lo que podría tener implicaciones sobre la salud larval.

El análisis de diversidad alfa mediante la riqueza observada (OTUs) y el índice de Shannon permitió profundizar en la evaluación de la diversidad microbiana. Se observó que T28 a DPH 24 presentó la mayor riqueza observada, con una mediana cercana a 45-47 OTUs, sugiriendo que a esta temperatura y tiempo de desarrollo se alcanza una mayor complejidad microbiana. En contraste, los tratamientos T20 y T26 a DPH 24 mostraron una menor riqueza y una distribución más homogénea (medianas de 36 y 30 OTUs, respectivamente), posiblemente reflejando comunidades más estables o dominadas por un menor número de OTUs; esto podría deberse a que temperaturas más bajas limitan el crecimiento y la diversificación de ciertos grupos microbianos, favoreciendo una comunidad más especializada y menos diversa (Egerton et al., 2018).

El índice de Shannon, que combina riqueza y equitatividad, mostró patrones distintos. A los 7 DPH, se evidenció una disminución de la diversidad con el aumento de la temperatura. Sin embargo, a los 24 DPH, esta tendencia se invirtió parcialmente, con T28 mostrando la mayor diversidad (3.7), mientras que T26 registró el valor más bajo (3.3). Esta variabilidad sugiere que el impacto de la temperatura en la diversidad microbiana no es lineal y puede depender del estado fisiológico de las larvas y de la etapa de desarrollo (Clements et al., 2014) lo que puede indicar a una comunidad menos diversa, pero más especializada y eficiente, capaz de contribuir de manera directa al crecimiento del hospedador.

Desde un punto de vista ecológico y funcional, las familias bacterianas identificadas en los tratamientos tienen roles potencialmente importantes en la salud larval. Como, por ejemplo, Vibrionaceae, que predominó durante las primeras etapas y aunque su presencia es común en sistemas acuáticos, incluye especies patógenas, por lo que su dominancia temprana podría representar un riesgo si no es controlada (Austin y Zhang 2006). Por otro lado, las familias Rhodobacteraceae

y Pseudoalteromonadaceae encontradas con mayor predominancia en T20 a 24 DPH, y T26 a 24 DPH, podría ser beneficioso en etapas posteriores ya que son conocidas por producir compuestos bioactivos por su capacidad de competir contra patógenos (Wang et al., 2008; Gil et al., 2014).

Por último, la presencia predominante de *Alteromonadaceae* y *Stappiaceae* en T28 corresponde a temperaturas más altas lo que podría indicar un cambio hacia una microbiota más especializada o adaptada a condiciones de estrés térmico.

VIII. CONCLUSION

Este estudio demuestra que la temperatura es un factor determinante en el crecimiento y en la composición de la microbiota intestinal de las larvas de *T.macdonaldi*. La temperatura de 26° C se identificó como la condición óptima para maximizar el peso y la longitud larval, asociándose además con una microbiota más equilibrada y funcional a lo largo del desarrollo. Por el contrario, las temperaturas de 20 - 28° C afectaron negativamente el crecimiento y promovieron comunidades microbianas con perfiles que podrían reflejar condiciones de estrés o desequilibrio.

La dinámica observada entre un mejor desempeño en crecimiento y una sucesión microbiana más diversa y equilibrada resalta la importancia de considerar tanto parámetros fisiológicos como microbianos al evaluar el impacto ambiental en especies marinas en cultivo. Estos hallazgos no solo contribuyen a comprender la biología temprana de *T. macdonaldi*, sino que también ofrecen formación valiosa para optimizar condiciones en acuicultura, promoviendo la salud y el rendimiento de las larvas a través del manejo adecuado de la temperatura.

IX. REFERENCIAS

Al Saif, N., and Brazier, J. S. (1996). The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J. Med. Microbiol.* 45, 133–137. doi: 10.1099/00222615-45-2-133

Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I., and Griffith, D. R. W. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* 18, 93–96. doi: 10.1111/j.1365-2761.1995.tb01271.x

Austin, B., and Austin, D. (1999). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Chichester: Springer-Praxis.

Austin, B., & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*, 43(2), 119-124.

Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., and Muzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173–186. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009.

Banerjee, G., and Ray, A. K. (2017). Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis* 72, 1–11. doi: 10.1007/s13199-016-0441-8.

Blanch, A., Alsina, M., Simon, M., and Jofre, J. (1997). Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *J. Appl. Microbiol.* 82, 729–734. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00190.

Boutin S, Bernatchez L, Audet C, Derôme N. (2013). El análisis de redes de 2013 pone de relieve las complejas interacciones entre el patógeno, el huésped y la microbiota comensal. *PLoS ONE* 8, e84772

Cahill, M. M. (1990). Bacterial flora of fishes: a review. *Microb. Ecol.* 19, 21–41. doi: 10.1007/BF02015051.

Clark et al., 2013 T.D. Clark, E. Sandblom, F. Jutfelt.

Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations.

Clarridge, J.E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17, 840–862.

Clements, K. D., Pasch, I. B., Moran, D., and Turner, S. J. (2007). Clostridia dominate 16S rRNA gene libraries prepared from the hindgut of temperate marine herbivorous fishes. *Mar. Biol.* 150, 1431–1440. doi: 10.1007/s00227-006-0443-9.

Clements, K. D., Raubenheimer, D., and Choat, J. H. (2009). Nutritional ecology of marine herbivorous fishes: ten years on. *Funct. Ecol.* 23, 79–92. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01524.

Clements, K. D., Angert, E. R., Montgomery, W. L., and Choat, J. H. (2014). Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not. *Mol. Ecol.* 23, 1891–1898. doi: 10.1111/mec.12699.

Cisneros-Mata MA, Montemayor-López G, Román-Rodríguez MJ (1995) Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conserv Biol* 9:806–814.

Cisneros-Mata, M., Botsford, L.W., Quinn, J.F., (1997) Projecting of Totoaba macdonaldi, a population with unknown age-dependent variability. *Ecol.Appl* 7, 968–980.

Coronel-Yáñez L (2016) La totoaba: gigante del alto golfo de California. Centros de Estudio Sobre la Universidad de la Universidad Autónoma de Baja California, México

Dávila-Camacho, C. A., Galaviz-Villa, I., Lango-Reynoso, F., Castañeda-Chávez, M. D. R., Quiroga-Brahms, C., & Montoya-Mendoza, J. (2019). Cultivation of native fish in Mexico: cases of success. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 816-829.

Domingo-Ávila J, Fernández-Ronquillo M (2011) *Estudio del Potencial Acuícola del Cantón Milagro. Administración y Gerencia*. Ciencia UNEMI. Ecuador 98-106.

Dowd et al., 2006 W.W.Dowd, R.W.Brill, P.G. Bushnell, J.A.Musick

Standard and routine metabolic rates of juvenile sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*), including the effects of body mass and acute temperature change.

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). La microbiota intestinal de los peces marinos. *Fronteras de la microbiología*, 9, 873.

Enders and Boisclair, 2016 E.C. Enders, D. Boisclair Effects of environmental fluctuations on fish metabolism: Atlantic salmon *Salmo salar* as a case study

Escárcega, B. (2021). Co-alimentación durante el desarrollo temprano de larvas de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de cultivo).

M. Fang, Z. Lei, M. Ruilin, W. Jing, D. Leqiang, High temperature stress induced oxidative stress, gut inflammation and disordered metabolome and microbiome in tsinling lenok trout, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 266,2023,115607, ISSN 0147-6513.

Galaviz M, López L, Gasca AG, Gisbert E, Álvarez A, Sandoval G, True C (2013) Expression and activity of three digestive proteases in larvae of the totoaba (*Totoaba macdonaldi*). *larvi* 2013:135

Galaviz, M. A., López, L. M., Garcia-Gasca A., Alvarez-Gonzalez, C. A., True, C. D., y Gisbert, E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41: 1117–1130.

Gatesoupe, F.-J., Infante, J. L. Z., Cahu, C., and Quazuguel, P. (1997). Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158, 117–127. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00179-8.

Golovanova, I.L., Golovanov, V.K., Smirnov, A.K. *et al.* Efecto del aumento de la temperatura ambiente sobre la actividad amilolítica de la mucosa intestinal en peces de agua dulce. *Fish Physiol Biochem* **39**, 1497–1504 (2013).

Hamid, A., Sakata, T., and Kakimoto, D. (1979). Microflora in the alimentary tract of gray mullet. IV. Estimation of enzymic activities of the intestinal bacteria. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45, 99–106. doi: 10.2331/suisan.45.99.

Henderson, R. J., and Millar, R.-M. (1998). Characterization of lipolytic activity associated with a *Vibrio* species of bacterium isolated from fish intestines. *J. Mar.*

Itoi, S., Okamura, T., Koyama, Y., and Sugita, H. (2006). Chitinolytic bacteria in the intestinal tract of Japanese coastal fishes. *Can. J. Microbiol.* 52, 1158–1163. doi: 10.1139/w06-082.

Janda, J.M.; Abbott, S.L. Secuenciación del gen rRNA 16S para la identificación bacteriana en el laboratorio de diagnóstico: ventajas, peligros y trampas. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 2761–2764.

Korsnes, K., Nicolaisen, O., Skår, C. K., Nerland, A. H., and Bergh, Ø. (2006). Bacteria in the gut of juvenile cod *Gadus morhua* fed live feed enriched with four different commercial diets. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 296–301. doi: 10.1016/j.icesjms.2005.10.012.

Lauzon, H. L., Gudmundsdottir, S., Petursdottir, S., Reynisson, E., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., et al. (2010). Microbiota of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) rearing systems at pre-and posthatch stages and the effect of different treatments. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1775–1789. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04806.

Li, X., Li, R., Amenyogbe, E., Lu, Y. et al. (2024). Efectos del estrés a baja temperatura sobre los indicadores bioquímicos séricos, el microbioma intestinal y el transcriptoma del pámpano dorado juvenil (*Trachinotus ovatus*). *Aquacult Int* 32, 5551–5578.

Larios-Soriano, E., Re-Araujo, A. D., Gómez-Gil, B., Tovar Ramirez, D., TrejoEscamilla, I., & Galaviz, M. A. (2021). Reciprocal effect of temperature and dietary lipids on metabolic performance and gut microbiota of Yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) juveniles. *Aquaculture Research*, 52(12), 6189-6204.

López, L. M., Flores-Ibarra, M., Bañuelos-Vargas, I., Galaviz, M. A., & True, C. D. (2015). Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(4), 921–936.

MacDonald, N., Stark, J., and Austin, B. (1986). Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *FEMS Microbiol. Lett.* 35, 107–111. doi: 10.1111/j.1574-6968.1986.tb01508.x

Machuca, C., Reyes-Becerril, M., Monreal-Escalante, E. *et al.* *Totoaba macdonaldi* actualizado: biología, ecología, inmunología, nutrición, reproducción, genética, políticas y aspectos sociales. *Aquacult Int* 33, 133 (2025).

Mata-Sotres JA, Lazo JP, Baron-Sevilla B (2015) Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture* 437:292–296.

Mazuet, C., Legeay, C., Sautereau, J., Ma, L., Bouchier, C., Bouvet, P., et al. (2016). Diversity of group I and II *Clostridium botulinum* strains from France including recently identified subtypes. *Genome Biol. Evol.* 8, 1643–1660. doi: 10.1093/gbe/evw101.

Metcalf, D., Avery, B. P., Janecko, N., Matic, N., Reid-Smith, R., and Weese, J. S. (2011). *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe* 17, 85–86. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.02.008.

Miyake, S., Ngugi, D. K., and Stingl, U. (2015). Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes. *Mol. Ecol.* 24, 656–672. doi: 10.1111/mec.13050.

Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac. Res.* 41, 1553–1573. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02546.

Neuman, C., Hatje, E., Zarkasi, K. Z., Smullen, R., Bowman, J. P., and Katouli, M. (2016). The effect of diet and environmental temperature on the faecal microbiota of farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Res.* 47, 660–672. doi: 10.1111/are.12522.

Ou, W., Yu, G., Zhang, Y., & Mai, K. (2021). Avances recientes en el conocimiento de la microbiota intestinal de los peces marinos. *Ciencia y Tecnología de la Vida Marina*, 3, 434-448.

Pirozzi and Booth, 2009 .I.Pirozzi, M.A. Booth, The routine metabolic rate of mullet (Argyrosomus japonicus: Sciaenidae) and yellowtail kingfish (Seriola lalandi: Carangidae) acclimated to six different temperatures.

Ramirez, R. F., and Dixon, B. A. (2003). Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 227, 417–426. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00520-9.

Rawls, J. F. (2007). La infección entérica y la inflamación alteran la ecología microbiana intestinal. *Célula huésped y microbio* 2, 73–74.

Ray, A. K., Ghosh, K., and Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquac. Nutr.* 18, 465–492. doi: 10.1111/j.13652095.2012.00943.

Rayo, A.K.; Ghosh, K.; Ringø, E. Bacterias productoras de enzimas aisladas del intestino del pescado: una revisión. *Aquac. Nutr.* 2012,18, 465–492.

Reid, H. I., Treasurer, J. W., Adam, B., and Birkbeck, T. H. (2009). Analysis of bacterial populations in the gut of developing cod larvae and identification of *Vibrio logei*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* as pathogens of cod larvae. *Aquaculture* 288, 36–43. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.11.022.

Ringo, E. y Birkbeck, T. H. (1999). Microflora intestinal de larvas de peces y alevines. *Investigación en acuicultura* 30, 73–93.

Rognes et al., 2016
.T. Rognes, T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, F. MahéVSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics

Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int. Microbiol.* 5, 3–9. doi: 10.1007/s10123-0020051-6

Roman-Rodriguez MJ (1994) Edad y crecimiento de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert en el Alto Golfo de California. Centro de Investigacion Cientifica y de Educaci6n Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, Mexico, México.

Rombout, J. H., Abelli, L., Picchiatti, S., Scapigliati, G., and Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 616–626. doi: 10.1016/j.fsi.2010.09.001

Romero, J., Feijoó, C. G., and Navarrete, P. (2012). “Antibiotics in aquaculture– use, abuse and alternatives,” in *Health and Environment in Aquaculture*, ed. E. Carvalho (Rijeka: InTech).

Romero, J., and Navarrete, P. (2006). 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microb. Ecol.* 51, 422–430. doi: 10.1007/s00248-006-90379

Sakai, M., Yoshida, T., Atsuta, S., and Kobayashi, M. (1995). Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. *J. Fish Dis.* 18, 187–190. doi: 10.1111/j.1365-2761.1995.tb00276.

Schryver, P. y Vadstein, O. (2014). Teoría ecológica como fundamento para controlar la invasión patógena en la acuicultura. *Revista ISME* 8, 2360–8.

Schulte, 2015 .P.M. Schulte The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment *J. Exp. Biol.*, 218 (12) (2015), pp.1856-1866,

Secor, 2009 S.M. Secor Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response *J. Comp. Physiol.*, 179 (1) (2009), pp.1-56,

Serra, C.R., Oliva-Teles, A., Enes, P. *et al.* Dinámica de la microbiota intestinal en *Iubinas carnívoras (Dicentrarchus labrax)* alimentadas con dietas basadas en plantas. *Sci Rep* 11, 447 (2021).

Skrodenytė-Arbačiauskienė, V. (2007). Enzymatic activity of intestinal bacteria in roach *Rutilus rutilus* L. *Fish. Sci.* 73, 964–966. doi: 10.1111/j.1444-

2906.2007.01421.x

Srinivasan, R.; Karaoz, U.; Volegova, M.; MacKichan, J.; Kato-Maeda, M.; Miller, S.; Nadarajan, R.; Brodie, E.L.; Lynch, S.V. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLoS ONE* 2015,10, e117617.

Sugita, H., and Ito, Y. (2006). Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 336–342. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01943.x

Sugita, H., Shinagawa, Y., and Okano, R. (2000). Neuraminidase-producing ability of intestinal bacteria isolated from coastal fish. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 10–13. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00749.x

Alessandra L. Suzzi, Michael Stat, Troy F., Gaston, Nachshon Siboni,

Nathan L.R. Williams, Justin R. Seymour, Megan J. Huggett. (2023).

Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.-Y., Jeon, M.-J., Bai, S. C., Lee, W.-J., et al. (2006). Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.* 72, 310–321. doi: 10.1111/j.1444-2906.2006.01152.x

True, C. D. (2012). Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. *Universidad Autonoma de Baja California*.

True CD, Loera AS, Castro NC (1997) Technical notes: acquisition of broodstock of *Totoaba macdonaldi*: field handling, decompression, and prophylaxis of an endangered species. *Progress Fish Cult*

Urbanczyk, H., Ast, J. C., and Dunlap, P. V. (2011). Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 324–342. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x

Uzal, F. A., Songer, J. G., Prescott, J. F., and Popoff, M. R. (2016). *Clostridial Diseases of Animals*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9781118728291

Valenzuela-Quiñonez F, Arreguín-Sánchez F, Salas-Márquez S, García-De León FJ, Garza JC, Román-Rodríguez MJ, De-Anda-Montañez JA (2015) Critically endangered totoaba *Totoaba macdonaldi*: signs of recovery and potential threats after a population collapse. *Endanger Species Res* 29:1–11.

Vandenberghe, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., and Swings, J. (2003). Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* 219, 9–20. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00312-5

Volkoff H, Ronnestad I. (2020). Efectos de la temperatura en la alimentación y los procesos digestivos de los peces. *Temperatura* 7(4):307–320.

Wang, A. R., Ran, C., Ringø, E., and Zhou, Z. G. (2017). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev. Aquac.* 1–15. doi: 10.1111/raq.12191 [Epub ahead of print].

Wang, Y.; Qian, P.Y. Fragmentos conservadores en genes de ARNr 16S bacterianos y diseño de cebadores para amplicones de ADN ribosómico 16S en estudios metagenómicos. *PLoS ONE* 2009, 4, e7401.

Webster TMU, Rodríguez-Barreto D, Consuegra S, de Leaniz CG. (2019). Firmas de estrés inducidas por cortisol en el microbioma de los peces. *bioRxiv*, 826503

Wang, B., Zhang, S. Q., Dong, J. L., Li, Y., Jin, Y. X., Xiao, H. W., ... & Cui, M. (2022). Ambient temperature structures the gut microbiota of zebrafish to impact the response to radioactive pollution. *Environmental Pollution*, 293, 118539.

J.H. Xia, G. Lin, G. Hong Fu, Z.Y. Wan, M. Lee, L. Wang, X. Jun Liu, G. Hua Yue
The intestinal microbiome of fish under starvation *BMC Genomics*, 15 (2014), p. 266

Yang, S., Yang, X., Li, Y., Li, D. y Du, X. (2021). Las respuestas multinivel de *Acipenser baerii* y sus híbridos (*A. baerii* *A. schrenckii*) al estrés térmico crónico. *Acuicultura* 541:736773. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736773

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227. doi: 10.1038/nature11053

Yoon et al., 2017 S.-H. Yoon, S.-M. Ha, S. Kwon, J. Lim, Y. Kim, H. Seo, J. Chun
Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67 (2017), pp.1613-1617

Zhu, L.-Y., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L.-X., y Shao, J.-Z. (2013). Avances en la investigación de genes inmunorrelevantes para los peces: una descripción comparativa de la inmunidad innata y adaptativa en teleósteos. *Dev. Comparat. Immunol.* 39, 39–62. doi: 10.1016/j.dci.2012.04.001