



Caracterización de la microbiota intestinal de *Andinoacara rivulatus* (vieja azul) y *Cichlasoma festae* (vieja roja) provenientes del proyecto multipropósito “Baba”, en la Cuenca alta del río Guayas.

Avilés Aguirre, Daniela

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Dr. Ortiz Tirado, Juan Cristóbal

7 abril de 2021

Reporte de Urkund

Curiginal

Document information

Analyzed document	Analisis Urkund Daniela Avilés (1).docx (D101040579)
Submitted	4/9/2021 12:38:00 AM
Submitted by	Ortiz Tirado Juan Cristobal
Submitter email	jcortiz@espe.edu.ec
Similarity	5%
Analysis address	jcortiz.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

SA	PROYECTO DAFNA DROUET RACINES.URKUND.docx Document PROYECTO DAFNA DROUET RACINES.URKUND.docx (D51276959)	3
W	URL: http://ymbiont.ansp.org/wingu/library/Jimenez-Pardo_2015_Guia_Peces_Ecuador_Occi... Fetched: 1/14/2021 7:46:52 PM	9
SA	ictiofauna.docx Document ictiofauna.docx (D59849678)	3
SA	TESIS PINTO CEREZO ABEL - ZOOT OBSERVACIONES (1).docx Document TESIS PINTO CEREZO ABEL - ZOOT OBSERVACIONES (1).docx (D77811544)	2
SA	 piscicultura-1 (1).docx Document piscicultura-1 (1).docx (D35913630)	2
SA	Grupo_11_nivel_II_INP.docx Document Grupo_11_nivel_II_INP.docx (D42795912)	2
SA	TESIS MARIUXI CEVALLOS URKUND.docx Document TESIS MARIUXI CEVALLOS URKUND.docx (D64551519)	1
SA	TESIS MARIUXI CEVALLOS URKUND.docx Document TESIS MARIUXI CEVALLOS URKUND.docx (D64498317)	2
W	URL: https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/download/593/251/ Fetched: 3/3/2021 3:54:26 PM	1
SA	+TESIS PABLO CERÓN 2016+.docx Document +TESIS PABLO CERÓN 2016+.docx (D19527894)	1



JUAN
CRISTOBAL
ORTIZ TIRADO



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, "**Caracterizar la microbiota intestinal de *Andinoacara rivulatus* (vieja azul) y *Cichlasoma festae* (vieja roja) provenientes del proyecto multipropósito "Baba", en la Cuenca alta del río Guayas.**" fue realizado por la señorita **Avilés Aguirre, Daniela** el mismo que ha sido revisado y analizado en su totalidad, por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 07 de abril del 2021



.....
Dr. Ortiz Tirado, Juan Ortiz

C.C: 1709998163

Director



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Avilés Aguirre, Daniela** con cédula de ciudadanía n°1723729214, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Caracterizar la microbiota intestinal de *Andinoacara rivulatus* (vieja azul) y *Cichlasoma festae* (vieja roja) provenientes del proyecto multipropósito "Baba", en la Cuenca alta del río Guayas."** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 07 de abril del 2021

.....
Avilés Aguirre, Daniela

C.C.: 1723729214



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Autorización de Publicación

Yo, **Avilés Aguirre, Daniela** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Caracterizar la microbiota intestinal de *Andinoacara rivulatus* (vieja azul) y *Cichlasoma festae* (vieja roja) provenientes del proyecto multipropósito "Baba", en la Cuenca alta del río Guayas."** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolqui, 07 de abril del 2021

Avilés Aguirre, Daniela

C.C.: 1723729214

Dedicatoria

A Dios por ser mi fortaleza, mi refugio y mi esperanza cada mañana al despertar, todo lo que soy es gracias a él.

A mi madre Sandra por su amor incondicional por demostrarme que no hay límite para cumplir los sueños, por ser el motor de mi vida, por ayudarme a subir peldaños y darme ánimos para seguir luchando por lo que quiero, gracias por tú esfuerzo de cada día, sin ti no estaría donde estoy.

A mi padre Daniel por sus mimos, abrazos y alegrías de cada día, por enseñarme e inculcarme los mejores valores para seguir adelante, gracias por ser el mejor ejemplo y guía en el camino de nuestras vidas.

A mi hermana Made por ser mi complemento y mejor amiga con la que siempre puedo contar, por ser una parte esencial en mi vida y ser mi inspiración para luchar por mis sueños, por demostrarme fortaleza y valentía en momentos difíciles.

A mi tita Blanca Imelda (+) por siempre inculcarme y enseñarme el respeto, honestidad y esfuerzo para obtener las cosas, porque fue una mujer luchadora que nos enseñó a vivir la vida de la mejor manera como ella lo sabía, gracias por todo tu amor y cuidados siempre te llevo en mi corazón mi angelito.

A mi abuelita Virginia gracias porque desde pequeña he tenido la suerte de disfrutar a una mujer tan maravillosa, por ser como mi segunda madre por cuidarme, mimarme y darme tanto amor, te agradezco por enseñarme todo lo que hoy en día sé.

Agradecimientos

A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE y a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA 1 por los conocimientos brindados en toda la carrera universitaria, a sus docentes por la paciencia y dedicación para enseñar.

Al Dr. Juan Ortiz por darme la oportunidad de formar parte de este gran proyecto y por su apoyo incondicional, al Ing. Gustavo Naranjo por la paciencia, el aporte de sus conocimientos y la guía en la realización de este proyecto, por ser un gran profesional y por su amistad.

A la convocatoria INÉDITA—SENESCYT por el financiamiento para la realización de este proyecto.

A mi familia por darme la fuerza y las palabras de aliento en el transcurso de este camino, sin ustedes este sueño no fuera posible.

A mis amigos Rafa, Pame, Karen, Bere, Vale y Arni por ser indispensables por su gran amistad en todos estos años y hacer el paso por la universidad una bonita experiencia.

A José Sebastián por su apoyo en toda la carrera, por sus consejos, por impulsarme a luchar por mis sueños.

Índice de Contenidos

Carátula.....	1
Reporte de Urkund	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenidos.....	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	13
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I	17
Introducción	17
Antecedentes	17
Justificación	19
Objetivos.....	21
<i>Objetivo general</i>	21

<i>Objetivos específicos</i>	21
Hipótesis.....	21
Capítulo II	22
Revisión Literaria	22
Cultivo Endémicos en el Ecuador	22
<i>Generalidades</i>	22
<i>Vieja Roja (Cichlasoma festae)</i>	25
<i>Vieja Azul (Andinoacara rivulatus)</i>	27
Domesticación de Especies en Acuicultura	29
<i>Generalidades de la Acuicultura</i>	29
<i>Generalidades de la domesticación de especies</i>	30
<i>Desarrollo de dietas</i>	34
Microbioma Intestinal.....	36
<i>Métodos de obtención del microbioma</i>	38
<i>Importancia del microbioma</i>	39
Capítulo III	41
Materiales y Métodos	41
Ubicación y características del área de estudio	41
Obtención de Especímenes.....	42
Identificación taxonómica molecular de especies.....	43

	10
<i>Obtención de la Muestra</i>	43
<i>Extracción de ADN</i>	43
<i>Secuenciación de gen Cytb</i>	45
<i>Análisis del microbioma</i>	46
<i>Obtención de la Muestra</i>	46
<i>Extracción de ADN</i>	46
<i>Secuenciación</i>	47
<i>Análisis Bioinformático de Secuencias</i>	48
<i>Análisis Estadístico</i>	49
Capítulo IV	50
Resultados y Discusión	50
Identificación taxonómica de las especies	50
<i>Identificación Morfológica</i>	50
<i>Identificación Molecular</i>	53
Caracterización de la Microbiota Intestinal	55
<i>Diversidad Alfa del Microbioma</i>	55
<i>Abundancia Taxonómica</i>	58
Nivel Filo.	58
Nivel Clase.	60
Nivel Orden.	61

	11
Nivel Familia.....	63
Nivel Género.....	65
Nivel Especie.....	67
Núcleo de Diversidad	69
Capítulo V.....	73
Conclusiones y Recomendaciones.....	73
Conclusiones.....	73
Recomendaciones.....	74
Bibliografía	75

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Cíclidos endémicos en aguas continentales de la vertiente occidental del Ecuador</i>	24
Tabla 2 <i>Niveles de domesticación de peces para la acuicultura</i>	32
Tabla 3 <i>Comportamiento de Vieja colorada bajo condiciones controladas y medición de parámetros productivos</i>	33
Tabla 4 <i>Análisis proximal y los valores energéticos de organismos más utilizados como alimento vivo para el cultivo y reproducción de peces ornamentales</i>	35
Tabla 5 <i>Requerimientos nutricionales en las diferentes etapas de desarrollo y el hábito de alimentación en peces ornamentales</i>	36
Tabla 6 <i>Identificación taxonómica de las especies vieja azul y vieja roja</i>	55
Tabla 7 <i>Índices de diversidad para las comunidades de bacterias presentes en el intestino de A. rivulatus y C. festae</i>	58

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Cuerpo de las especies de la familia Cichlidae</i>	22
Figura 2 <i>Especie Vieja roja Cichlasoma festae</i>	27
Figura 3 <i>Especie Vieja Azul (Andinoacara rivulatus)</i>	29
Figura 4 <i>Ubicación geográfica del Proyecto multipropósito Baba</i>	42
Figura 5 <i>Identificación y selección de las especies Vieja roja y azul para su respectivo análisis</i>	43
Figura 6 <i>Procedimiento para la obtención de muestras y extracción de ADN de aletas de las especies Vieja roja y Vieja azul</i>	44
Figura 7 <i>Procedimiento para la obtención de muestras y extracción de ADN de intestinos de las especies Vieja roja y Vieja azul</i>	47
Figura 8 <i>Flujo de trabajo de la secuenciación NGS por plataformas Illumina</i>	48
Figura 9 <i>Flujo de trabajo estandarizado por la guía de uso del programa QIIME 2</i>	49
Figura 10 <i>Espécimen de Vieja azul</i>	51
Figura 11 <i>Espécimen de Vieja roja</i>	52
Figura 12 <i>Especie Cichlasoma ornatum</i>	53
Figura 13 <i>Gráfico de rarefacción para el número de OTUS (riqueza) en las dos especies de estudio, a una profundidad de lectura máxima de aproximadamente 9000 secuencias</i>	56
Figura 14 <i>Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especie Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Filo</i>	59

Figura 15 <i>Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Clase.....</i>	61
Figura 16 <i>Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Orden</i>	62
Figura 17 <i>Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Familia.....</i>	64
Figura 18 <i>Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Género.....</i>	66
Figura 19 <i>Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Especie.....</i>	68
Figura 20 <i>Diagramas de Venn mostrando OTUs únicos y compartidos de las dos especies en estudio A. rivulatus y C.festae con sus respectivas muestras</i>	72

Resumen

La microbiota, juega un papel importante dentro de los mecanismos de respuestas inmunológicas innatas en el pez, además de ser promotores del metabolismo de los nutrientes y estimulantes de la proliferación epitelial. Así, la microbiota normal del intestino en peces es benéfico y contribuye a los procesos nutricionales de los organismos, evitando la colonización por patógenos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar el microbioma intestinal de *Andinoacara rivulatus* (Vieja azul) y *Cichlasoma festae* (Vieja Roja) originarios de la Cuenca alta del río Guayas como punto de partida para la comprensión de la misma en estas especies con potencial acuícola. En primer lugar, se identificó a las especies de estudio mediante comparación morfológica y comparación de secuencias del gen *cytB*. Se obtuvo la diversidad y composición de la microbiota, a partir de secuenciación de las zonas V3-V5 del gen 16s rRNA en muestras intestinales, las mismas que fueron analizadas por el software QIIME 2. Se logró corroborar la identidad esperada de las especies con una similitud de secuencias mayor al 99,91% para *Cichlasoma festae* y mayor al 99,63% para *Andinoacara rivulatus*. Se determinó una diversidad de los microbiomas, los cuales fueron similares entre las dos especies, (Cf y Ar = 87 Unidades taxonómicas operativas (OTU's), Shannon Cf= 4,18 y Shannon Ar = 4,39, $p > 0.05$). Además, se evidenció una similitud de 45 OTU's entre las dos especies, mientras que 45 y 19 OTU's fueron exclusivos para *A. rivulatus* y *C. festae* respectivamente. Por otro lado, la composición del microbioma es similar entre las dos especies en todos los niveles taxonómicos, en donde se pudo caracterizar la presencia de Proteobacterias (*Plesiomonas Shigelloides* y *Aeromonas*), Bacteroidetes (Bacteroidales) y Firmicutes (*Clostridium* y *Peptostreptococcaceae*). La especie bacteriana *Cetobacterium somerae* (única representante de las Fusobacterias) fue evidentemente más abundantes para *A. rivulatus*, mientras que los Bacteroidetes lo fueron en *C. festae*.

Palabras clave: *Andinoacara rivulatus*, *Cichlasoma festae*, microbioma, identificación taxonómica.

Abstract

The microbiota plays an important role within the mechanisms of innate immune responses in fish, in addition to being promoters of the metabolism of nutrients and stimulants of epithelial proliferation. Thus, the normal gut microbiota in fish is beneficial and contributes to the nutritional processes of organisms, preventing colonization by pathogens. Therefore, the objective of this study was to characterize the intestinal microbiome of *Andinoacara rivulatus* (Vieja azul) and *Cichlasoma festae* (Vieja Roja) originating in the upper basin of the Guayas River as a starting point for understanding it in these species with aquaculture potential. First, the study species were identified by morphological comparison and comparison of cytB gene sequences. The diversity and composition of the microbiota was obtained from the sequencing of the V3-V5 zones of the 16s rRNA gene in intestinal samples, which were analyzed by QIIME 2 software. It was possible to corroborate the expected identity of the species with a sequence similarity greater than 99.91% for *Cichlasoma festae* and greater than 99.63% for *Andinoacara rivulatus*. A diversity of microbiomes was determined, which were similar between the two species, (Cf and Ar = 87 Operative taxonomic units (OTU s), Shannon Cf= 4.18 and Shannon Ar = 4.39, $p > 0.05$). In addition, there was a similarity of 45 OTU s between the two species, while 45 and 19 OTU s were exclusive for *A. rivulatus* and *C. festae* respectively. On the other hand, the composition of the microbiome is similar between the two species at all taxonomic levels, where the presence of Proteobacteria (*Plesiomonas Shigelloides* and *Aeromonas*), Bacteroidetes (Bacteroidals) and Firmicutes could be characterized (*Clostridium* and *Peptostreptococcaceae*). The bacterial species *Cetobacterium somerae* (only representative of the Fusobacterias) was evidently more abundant for *A. rivulatus*, while the Bacteroidetes were more abundant in *C. festae*.

Keywords: *Andinoacara rivulatus*, *Cichlasoma festae*, microbiome, taxonomic identification.

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

En la actualidad la producción acuícola mundial proporciona 81% de mariscos, 76% pescado de agua dulce, 69% salmón y 42% de camarón que se consume en el mundo, con un volumen total de 171 millones de toneladas e ingresos por 232 mil millones de dólares en volúmenes de venta, se calcula que la pesca y la acuicultura constituyen el medio de subsistencia para 540 millones de personas (FAO, 2018). En términos per cápita, el consumo de pescado comestible aumentó de 9,0 kg en 1961 a 20,2 kg en 2015, a una tasa media de aproximadamente un 1,5% al año donde el pescado representó el 17% de proteína animal consumida por la población mundial (FAO, 2018).

Las estimaciones preliminares relativas a los años 2016 y 2017 apuntan a un nuevo aumento hasta alcanzar unos 20,3 kg y 20,5 kg, respectivamente (FAO, 2018). En Ecuador el suministro de proteína animal está representada por la producción de carne de pollo, cerdo y res representando el promedio per cápita con un 17,63, mientras que la carne de pescado en un 1,62 Kg/persona/año (FAO, 2018). Los volúmenes de producción acuícola en el Ecuador según la FAO, alcanzan las 464 mil toneladas aproximadamente, donde el 94% de la producción se encuentra representada por el cultivo de camarón, 6% por la producción de peces continentales (especies exóticas como trucha y tilapia) y el 0.5% por el cultivo de especies nativas como cachama, paiche, boquichico, carpa y otros (Tufiño et al., 2019).

La gran demanda alimenticia que existe a nivel mundial aún no es sostenible por la acuicultura a pesar del aumento mencionado, siendo la captura la principal fuente de pescado en zonas rurales. Esto ha llevado a una disminución en las poblaciones de las especies ícticas, tanto en mar abierto como en aguas continentales (FAO, 2018). La Cuenca del río Guayas se ha visto inmersa en este fenómeno, con una reducción del 71,5% en volúmenes de pesca, es decir de 600 Tn a 172 Tn (FAO, 2018), en especial con la disminución de especies ícticas, como los cíclidos nativos *Andinoacara rivulatus* (vieja azul) y *Cichlasoma festae* (vieja roja) (Ortiz, 2019). Este problema se ve agravado por varios factores como la contaminación hídrica de cuencas y microcuencas, sobre pesca artesanal, restricción de acceso a los sitios de reproducción por la construcción de represas (Tufiño et al., 2019).

Muchas especies continentales son fuente de alimentación e ingresos económicos para las comunidades ribereñas, pero como se mencionó anteriormente se ha producido una sobreexplotación de este recurso, poniendo en peligro grave la población de estas. La domesticación de estas especies en una alternativa viable para suplir las necesidades de las comunidades y evitar la pesca constante. Sin embargo, es un proceso que demanda de mucho esfuerzo y estudios para lograrlo, ya que es necesario conocer la biología y fisiología de esta, a fin de suplir en cultivo lo que requiere para su crecimiento, reproducción, adaptación, etc (Gallegos et al., 2015).

Muchos de los peces nativos de Sudamérica tienen un alto potencial de cultivo controlado e incremento de los volúmenes de producción para su comercialización, por ejemplo, la cachama (*Colossoma macropomum*) y el paiche (*Arapaima gigas*), en donde el desarrollo de paquetes tecnológicos ha permitido un aumento sostenido de la producción. En

este ámbito, se ha empezado a indagar el cultivo de otras especies nativas perteneciente al grupo de los cíclidos como la vieja azul y la vieja colorada en el litoral ecuatoriano. Sin embargo, para mejorar su cultivo es necesario investigar a profundidad los procesos biológicos y fisiológicos de la especie en áreas del conocimiento como la reproducción, nutrición, bienestar animal y mejoramiento genético. Bajo esta condición, la proyección de cultivo de estas especies es para policultivo y a escala industrial (Rodríguez et al., 2014).

Justificación

En las especies Vieja Roja y Azul, no hay suficiente información sobre funciones fisiológicas a nivel reproductivo y digestivo (perfil enzimático, microbiota), descripción anatómica, ecología entre otros conocimientos de línea base para la producción acuícola, lo que a su vez desacelera el proceso de domesticación de estas especies, al basar los sistemas de crianza en resultados netamente empíricos. Bajo esta condición los productores locales, optan por cultivos de especies exóticas como la tilapia, por su facilidad de manejo y dietas disponibles (Ortiz, 2019). Sin embargo, estas especies exóticas generan un impacto ambiental por la posibilidad de escape a las cuencas naturales y el posible desplazamiento y pérdida de hábitats de otros cíclidos nativos. Bajo esta condición y con un enfoque al desarrollo del conocimiento digestivo de especies nativas, es importante rescatar información básica relacionada a la diversidad de la microbiota, con la finalidad de ser utilizada en estudios de impacto ambiental, formulación de dietas, o bien en el comportamiento del sistema inmune de los organismos acuáticos en estudio (Sicilia et al., 2009).

El conocimiento de la anatomía y fisiología del tracto digestivo de ambos cíclidos nativos, así como su forma y tipo de alimentación, permitirán una comprensión más acertada de

las necesidades nutricionales, y a su vez el desarrollo de mejores dietas. Dentro de la fisiología digestiva, el intestino juega un rol importante en el catabolismo y absorción de nutrientes, en donde la microbiota tiene un aporte indispensable en dichas funciones (Ramírez et al., 2018).

La microbiota intestinal está compuesta por diversas poblaciones de microorganismos que muestran una extensa gama de actividades metabólicas como por ejemplo la producción de enzimas digestivas para complementar estos procesos y metabolitos secundarios. También tiene una importante acción en el control de microorganismos patógenos, a través de la competencia por nutrientes y sitios de adhesión que producen sustancias antimicrobianas (Ramírez et al., 2018).

La composición de la microbiota intestinal se ve afectada por el hábitat, nivel trófico (dieta), temporada, cautiverio, edad, genética, sexo, enfermedades, entre otros (Pérez et al., 2020). Por lo cual la pérdida del equilibrio de la microbiota afecta al estado fisiológico del huésped, comprometiendo potencialmente la inmunidad, su crecimiento, el desarrollo en general y la calidad de la producción acuícola debido a un aumento de la morbilidad y mortalidad de los peces (Pérez et al., 2020). Por lo tanto, el estudio de la microbiota basal, es decir en condiciones naturales de la especie, permitiría observar y evaluar el efecto que tiene los procesos de domesticación, en especial el cambio de ambiente y la administración de pienso, lo que a su vez permite la mejora en el sistema de cultivo al adaptarla a las necesidades de la especie (Garzón & Espinosa, 2019).

En los últimos años, los estudios acerca de la microbiota han aumentado debido a las nuevas tecnologías de secuenciación de nueva generación y herramientas bioinformáticas que permiten la investigación sobre la diversidad de bacterias (Correa, 2018). El análisis de las

secuencias hipervariables del gen 16S ribosomal, ha permitido descubrir la amplia diversidad existentes en los microbiomas, permite el análisis de varias muestras en tiempos cortos y sin la utilización de varios medios y técnicas de aislamiento (Butt & Volkoff, 2019). El uso de estas tecnologías ha permitido conocer la conformación de los microbiomas en varias especies, lo que a su vez contribuye con el entendimiento de su función en los procesos biológicos del huésped. (Krajmalnik et al., 2012).

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la microbiota intestinal de *Andinoacara rivulatus* (vieja azul) y *Cichlasoma festae* (vieja roja) provenientes del proyecto multipropósito “Baba”, en la Cuenca alta del río Guayas.

Objetivos específicos

Identificar molecularmente a las especies *Andinoacara rivulatus* (vieja azul) y *Cichlasoma festae* (vieja roja) mediante secuenciación del gen citocromo b.

Determinar la abundancia, riqueza y diversidad de las bacterias presentes en el intestino de Vieja roja y de Vieja azul por secuenciación masiva.

Hipótesis

H1: La abundancia y riqueza de bacterias presentes en el intestino de *Cichlasoma festae* (vieja roja) difiere en la abundancia y riqueza de bacterias presentes en el intestino de *Andinoacara rivulatus* (vieja azul).

Capítulo II

Revisión Literaria

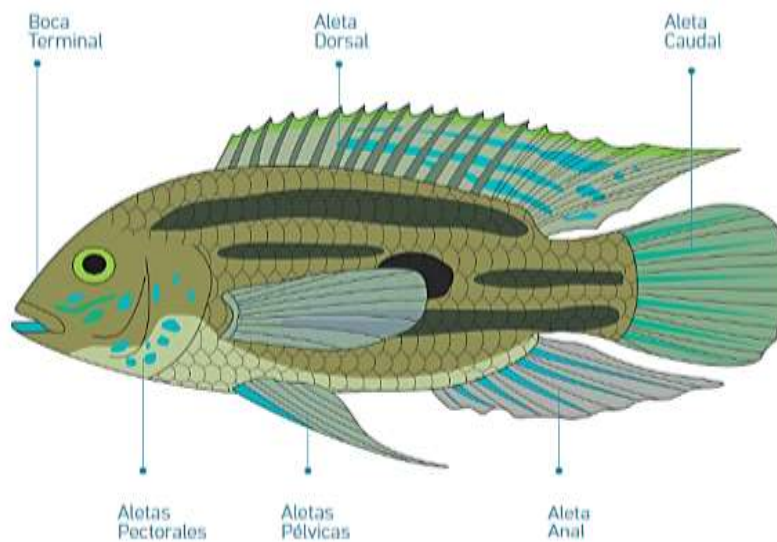
Cultivo Endémicos en el Ecuador

Generalidades

Las especies de peces familia Cichlidae poseen un cuerpo con escamas, aleta dorsal larga con varias espinas y radios blandos, aletas pélvicas al mismo nivel que las aletas pectorales y ausencia de aleta adiposa (Figura 1). Sus hábitos son diurnos y viven en diferentes sectores de la columna de agua, en troncos o vegetación sumergida y no forman cardúmenes (Nugra et al., 2018). Esta familia es una de las más abundantes en los peces con aproximadamente 1666 especies válidas alrededor del mundo, distribuidas principalmente en aguas dulces y salobres de tipo subtropical y tropical en América y África (Eschmeyer et al., 2014).

Figura 1

Cuerpo de las especies de la familia Cichlidae



Nota. Recuperado de *Guía de Peces del Alto Nangaritza* por Nugra et al. (2018). Universidad del Azuay.

Sudamérica es la región que constituye con la mayor riqueza de peces de agua dulce del mundo, alcanzando 4035 especies (Lévêque et al., 2008), dentro de esta diversidad la familia Cichlidae es una de las más abundantes, registrándose cíclidos en casi todas las cuencas hidrográficas de la región, aunque es poco común encontrarlas en elevaciones mayores a 1200 m.s.n.m (Nugra et al., 2018).

Según (Barriga, 2012), la riqueza de peces de agua dulce del Ecuador es notable dentro de la región, comparándose a otros países Sudamericanos como Colombia y Perú. En la vertiente occidental ecuatoriana, se destaca la Cuenca del Guayas la cual presenta una superficie de 32.891 km² y el número de especies ícticas es de 70 peces, de los cuales 24 son endémicas del Ecuador (Prado et al., 2015). Dentro de estas especies endémicas se encuentran 5 especies de cíclidos (Tabla 1), los cuales también se encuentran distribuidos en las seis principales cuencas hidrográficas de la costa: cuenca binacional del Mira-Mataje, sistema Santiago-Cayapas, cuenca del río Esmeraldas, cuenca del río Guayas, cuerpos de agua asociados al sistema Santa Rosa y finalmente la cuenca binacional del Catamayo-Chira (Prado et al., 2015).

Tabla 1*Cíclidos endémicos en aguas continentales de la vertiente occidental del Ecuador*

Orden	Familia	Especie	Distribución
Perciformes	Cichlidae	<i>Andinoacara blombergi</i> (Wijkmark, Kullander, & Barriga, 2012)	Cuenca Santiago-Cayapas Cuenca del Esmeraldas
		<i>Andinoacara rivulatus</i> (Günther, <i>Andinoacara rivulatus</i> , 1860)	Cuenca del Esmeraldas Cuenca del Guayas Cuenca de Santa Rosa Cuenca del Catamayo
		<i>Andinoacara sapayensis</i> (Regan, <i>Andinoacara sapayensis</i> , 1903)	Cuenca Santiago-Cayapas
		<i>Cichlasoma festae</i> (Boulenger, <i>Cichlasoma festae</i> , 1899)	Cuenca Santiago-Cayapas Cuenca del Esmeraldas Cuenca del Guayas Cuenca de Santa Rosa Cuenca del Catamayo
		<i>Cichlasoma ornatum</i> (Regan, 1905)	Cuenca San Juan-Mira Cuenca Santiago-Cayapas Cuenca del Guayas

Nota. Recuperado de Guía de peces para aguas continentales de la Vertiente Occidental del Ecuador por Prado et al. (2015). Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Esmeraldas (PUCESE); Universidad del Azuay (UDA) y Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN) del Instituto Nacional de Biodiversidad. Esmeraldas, Ecuador.

En el subtrópico ecuatoriano la presencia e importancia de los cíclidos endémicos recae en las especies vieja azul (*Andinoacara rivulatus*) y vieja roja (*Cichlasoma festae*). Las adaptaciones morfológicas que poseen estos cíclidos se especializan para un régimen de dieta, dichas adaptaciones ocurren en la estructura de la boca, las branquiespinas y en los órganos de digestión (Rodríguez, 2012), así como también tienen la capacidad de adaptarse a una variedad

de condiciones ambientales, principalmente salinidad y temperatura (González, 2017). Estas especies son consideradas fuente de alimento e ingresos para la población rural en ciudades de la costa como Buena Fe, Babahoyo, Quevedo, Patricia Pilar, Puerto Quito entre otras, pero se ve afectada su conservación por varios factores antropogénicos, generando problemas para los pescadores artesanales por volúmenes bajos de extracción.

Vieja Roja (Cichlasoma festae)

Es un pez nativo de aguas cálidas de la zona continental de América del Sur, pertenece a la familia Cichlidae donde su taxonomía se la observa en la parte inferior del texto; es abundante en aguas continentales del Ecuador, Colombia y Perú. Esta especie también es conocida como Vieja colorada, vieja de montaña porque es común en ríos premontanos, de fondo rocoso y aguas templadas (Revelo & Laaz, 2012).

Taxonomía Vieja roja (*Cichlasoma festae*)

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Subclase	Neopterygii
Orden	Perciformes
Familia	Cichlidae
Género	Cichlasoma
Especie	<i>Cichlasoma festae</i>

Fuente: (Nuñez, 2019) (Boulenger, 1899).

Con respecto a los aspectos fisiológicos de esta especie existe una similitud con la tilapia (*Oreochromis sp*) por su peso, ya que, pueden superar los 2000 gramos y 30 cm de longitud cuando alcanzan su máximo desarrollo. A simple vista estas dos especies se pueden confundir, de igual manera ocurre con los juveniles por la coloración que poseen, ya que presentan un

color gris oscuro en las terminaciones de las aletas pectorales y las diez franjas negras que poseen (Carrillo, 2009).

Esta especie tiene un régimen alimenticio omnívoro con tendencia carnívora según (Revelo & Laaz, 2012), predador de crustáceos e insectos, se ha probado que, de acuerdo a sus necesidades nutricionales se le ha suministrado dietas balanceadas de tilapia y trucha arcoíris, además de Artemia salina, lo que fue favorable para su supervivencia, en cambio en la guía de peces para aguas continentales de la Vertiente Occidental del Ecuador mencionan que es un pez omnívoro y su dieta se basa en peces, caracoles, crustáceos y plantas acuáticas (Prado et al., 2015).

Tanto machos como hembras son territoriales, cuando se trata de proteger a sus crías (Nuñez, 2019). Presentan una cabeza grande, su cuerpo es lateralmente comprimido, en la zona de la región anterior de la cabeza sus escamas son grandes, boca terminal con pequeños dientes caninos, su maxilar no puede alcanzar el borde anterior del ojo (Chávez & Litardo, 2019).

El pedúnculo caudal tiene la característica de ser más alto que largo, línea lateral interrumpida, su aleta caudal es de borde redondeado, presenta una mancha oscura redondeada en el pedúnculo caudal a cada lado; las aletas caudal, anal y dorsal tienen una coloración roja (Lara, 2019), la aleta anal presenta 4 o más espinas, unas escamas en la línea lateral de 26 a 27 y mandíbula inferior ligeramente más proyectada (en adultos) (Prado et al., 2015).

Su coloración varía según el sexo, las hembras presentan bandas verticales negras y una coloración intensa verdosa, mientras que los machos no poseen estas bandas y ligeramente visibles, con tonalidades rojizas y verdosas en el cuerpo y en especial las aletas pectorales son

amarillentas, las demás de color rojizo oscuro. Su distinción es muy notoria referente a otros cíclidos por su tonalidad y espinas que poseen, estas son fuertes encontradas en la aleta dorsal y anal (Lara, 2019)

Figura 2

Especie Vieja roja Cichlasoma festae



Nota. A) Vieja roja macho, B) Vieja roja hembra. Fuente: (Ortiz, 2020).

Vieja Azul (Andinoacara rivulatus)

Esta especie americana pertenece a la familia Cichlidae donde su taxonomía se la observa en la parte inferior del texto; su distribución está presente desde el río Esmeralda hasta Huaquillas, a lo largo del Océano Pacífico, está presente en los ríos de las provincias del Guayas, Los Ríos y Santo Domingo (González et al., 2016). Es un pez omnívoro de hábitos herbívoros-insectívoros en el ambiente natural, son dóciles en cuanto a su producción en cautiverio ya que aceptan el alimento balanceado con facilidad por lo que es fácil su cuidado (Ajila, 2019).

Taxonomía vieja azul (*Andinoacara rivulatus*)

Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Pisces
Clase	Osteichthyes
Superorden	Acanthoptergii
Orden	Perciformes
Suborden	Percoidei
Familia	Cichlidae
Subfamilia	Cichlasomatinae
Género	Andinoacara
Especie	<i>Andinoacara rivulatus</i>
Nombre común	Vieja azul

Fuente: (Lara, 2019).

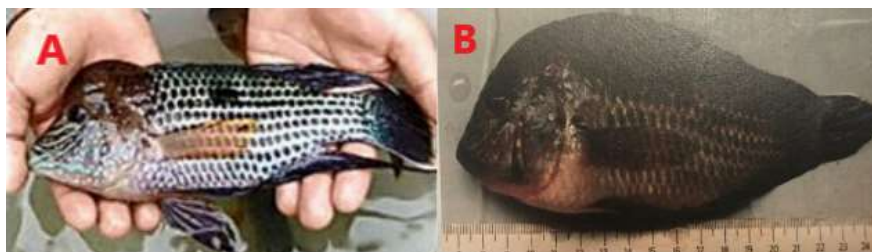
Este pez presenta un gran tamaño, los machos pueden alcanzarlos 30 cm y las hembras suelen quedarse en los 20 cm. Es una especie bento-pelágica de agua fresca tropical con una temperatura oscilatoria entre 20°C - 24°C, posee cabeza redondeada con protuberancia en la parte superior, boca terminal, un cuerpo robusto con pedúnculo caudal reducido; no presenta aleta adiposa (Nugra et al., 2018), en la parte inferior de la cabeza presenta unos reflejos azul intenso a manera de rayas en ambos sexos, intensificándose cuando están en etapa reproductiva (Chávez & Litardo, 2019).

Su cuerpo es alto y comprimido lateralmente; y cuatro o cinco manchas detrás de la mancha lateral. Tanto los machos como las hembras tienen en la zona del mentón y la mejilla múltiples líneas de color azul eléctrico y una mancha negra a la mitad del costado. Los machos adultos desarrollan con el tiempo una giba frontal y poseen la aleta dorsal y anal más larga mientras que, la hembra es de un color verde oliva sin los reflejos metálicos del macho, es posible observar que la diferencia entre machos y hembras radica en la forma de las aletas

(Prado et al., 2015), presentan una aleta dorsal larga continua con 14 espinas y 11 radios ramificados, sus aletas terminan en punta; en las hembras redondeadas (Nugra et al., 2018).

Figura 3

Especie Vieja Azul (Andinoacara rivulatus)



Nota. A) Vieja azul macho, B) Vieja azul hembra. Fuente: (Ortiz, 2019).

Domesticación de Especies en Acuicultura

Generalidades de la Acuicultura

La FAO define a la Acuicultura como un cultivo de organismos acuáticos encontrados en zonas costeras que involucra intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción, es el más ágil y rápido sector en cuanto a producción de alimentos que según la (FAO, 2018) representa a nivel mundial el 50% del pescado que está destinado a la alimentación. La producción acuícola actual procede de animales encontrados en la cadena alimentaria en la parte inferior como: peces omnívoros, herbívoros y moluscos los cuales representan el 80%.

En todo el mundo existen 580 especies acuáticas aproximadamente que son cultivadas y estas representan una alta diversidad genética dentro y entre las especies. Según (FAO, 2018) la acuicultura es de mayor importancia para los agricultores pobres de los países en desarrollo debido a que, consumir pescado forma parte de una tradición cultural y es beneficioso para la

salud por su excelente perfil nutricional, es una buena fuente de proteínas, ácidos grasos, vitaminas, minerales y micronutrientes esenciales. Del mismo modo las plantas acuáticas (algas) son alimentos de importancia para la acuicultura, las cuales aportan nutrición, medios de subsistencia y otros usos industriales (FAO, 2010).

En la acuicultura ecuatoriana más del 95 por ciento pertenece al cultivo del camarón marino (*Litopenaeus spp*), esta actividad está dominada principalmente por el camarón blanco *Penaeus vannamei* , y en un porcentaje mucho menor por el *Penaeus stylirostris.*, seguido del cultivo de la Tilapia (*Oreochromis niloticus*), la variedad que Ecuador exporta es la tilapia roja, un tetrahíbrido resultante del cruce entre cuatro especies representativas del género *Oreochromis*: *O. mossambicus* (Mozambica), *O. niloticus* (Nilótico), *O. hornorum* y *O. aureus* (Aurea) (Sicilia et al., 2009)., y el porcentaje restante a otras especies (peces y crustáceos de agua dulce) (FAO , 2005).

La acuicultura de agua dulce, tiene su mayor desarrollo en la región interandina, básicamente con los centros de cultivo de la trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*), este cultivo tiene un crecimiento en el sector piscícola muy favorable en un futuro y el cultivo del Chame tiene algunos avances en la región Costa (FAO , 2005).

Generalidades de la domesticación de especies

La FAO menciona que la domesticación es un proceso donde la población de una especie determinada es sometida por el ser humano a una selección esto hace que el organismo adquiera o desarrolle, ciertos caracteres morfológicos, fisiológicos o de comportamiento, los cuales son heredables, su finalidad es obtener determinados beneficios de dichas modificaciones. La domesticación comienza cuando los piscicultores toman el control del ciclo

de vida del pez y determinan las condiciones bajo las cuales se va a desarrollar como: tipo de alimento que se utilizará, densidad de población, gestión de la calidad del agua, y los procesos reproductivos (desove, fertilización) (FAO, 2015). Los primeros niveles de domesticación de una especie implican características básicas como lo es la pesca de captura y ensayos de aclimatación a un ambiente en cautiverio (Gonzabay, 2019).

La acuicultura es considerada como la única solución que puede proveer más productos pesqueros, ya que la captura de poblaciones silvestres ha alcanzado un límite superior, esta actividad es extensamente más joven que la agricultura y se fundamenta en fuentes naturales para cultivar numerosas especies. Un estudio sobre los niveles de domesticación en peces con un enfoque al futuro sostenible de la acuicultura, se propone una nueva clasificación para describir de una mejor manera las diversas estrategias de producción pesquera, esta clasificación comprende cinco niveles de “domesticación”, donde 1 es el menor y 5 el más domesticado (Teletchea & Fontaine, 2012) (tabla 2).

La producción acuícola es considera bajo 3 sistemas de cultivo donde sobresale el tipo de producción, el nivel de manejo y la tecnología aplicada. La acuicultura intensiva es una de ellas donde necesita un exhaustivo control en todas las etapas de producción, la infraestructura requiere un diseño adecuado que debe controlar el ingreso y la salida del agua, aprovecha en su totalidad el espacio para así aumentar la producción por área de trabajo que suple las necesidades nutricionales y valores energéticos de las especies (Ortiz, 2015).

Otro tipo es la acuicultura extensiva, a esta se la práctica como una actividad complementaria a otras ya que tiene bajas densidades de carga con limitaciones al momento de la siembra y cosecha de las especies, pero en Perú existen algunas experiencias bajo esta

práctica en varios ríos, lagos y represas en las cuales se han reintroducido alevines de boquichico, paiche (especie endémica) y tilapia (especie exótica) donde los pobladores hacen pescas temporales para comercialización y autoconsumo (Ortiz, 2015). Mientras tanto, la acuicultura semiintensiva es un sistema que interviene el hombre en el aporte de alimentos de forma complementaria, con este tipo de cultivo se incrementa la densidad de siembra dependiendo de la especie y el sitio. Se opta por el policultivo y se avala un uso adecuado de la cadena alimentaria presente en el agua, incrementada por la acción de los fertilizantes (Gonzabay, 2019).

Tabla 2

Niveles de domesticación de peces para la acuicultura

Nivel de domesticación	Descripción
0	Especie considerada como pesca de captura
1	Se llevan a cabo las primeras pruebas de aclimatación al entorno de cultivo.
2	Un fragmento del ciclo de vida es perfeccionado en cautiverio. Aún existen problemas en la etapa reproductiva y de engorde.
3	Se afina el ciclo de vida en todas sus etapas a un ambiente en cautiverio pero con el uso de insumos naturales (silvestres).
4	El ciclo de vida se afina en cautiverio sin la utilización de insumos naturales, ni programa de cría selectiva.
5	Se emplea el programa de cría selectiva como tasa de crecimiento, eficiencia de conversión alimenticia, edad de madurez sexual, resistencia a enfermedades, calidad de la carne.

Nota. Recuperado de *Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture* por (Teletchea y Fontaine, 2012).

En la especie nativa Vieja roja para su incorporación en la producción comercial en necesario determinar su adaptación en cautiverio y alimentación exógena, y posteriormente

realizar investigaciones de reproducción, crecimiento, engorde y sanidad, para llevar un manejo racional en base a las diferentes etapas de vida, utilizando niveles adecuados de proteína, energía y micro elementos en la dieta, además, promover una mejora genética (Rodríguez et al., 2014).

Bajo estas consideraciones se pudo rescatar algunos resultados importantes en la alimentación de Vieja colorada donde (Rodríguez et al., 2014) mencionan los diferentes porcentajes de proteína que varían del 28 hasta el 36%, pero con conversiones alimenticias desde 2,4 a 3. Bajo estas consideraciones muchos parámetros pueden mejorarse conociendo las características de la microbiota de los organismos y la inclusión de complementos alimenticios como vitaminas, enzimas digestivas, probióticos, etc (Tabla 3).

Tabla 3

Comportamiento de Vieja colorada bajo condiciones controladas y medición de parámetros productivos

Porcentaje de proteína	36 %	32%	28%
Peso inicial (Pi) g.	30.6±0.16	30.4±0.30	30.6±0.22
Peso final (Pf) g.	111.0±0.50	95.2±0.36	90.6±0.53
Peso ganado (PG) g.	80.4±0.09	64.8±0.18	60±0.22
Consumo de alimento (CTA) g.	11764.8±2.7	11193.6±4.0	10654.8±2.1
Incremento de peso (IP) g.	80.4±0.50	64.8±0.36	60±0.36
Incremento de Biomasa (IB) g.	4825±5.0	3888±3.6	3601±2.3
Conversión alimenticia (CA)	2.4±0.05	2.9±0.00	3±0.05
Supervivencia (SUP) %	100	100	100
Tasa de crecimiento absoluto (TCA) g/día	0.89±0.00	0.72±0.04	0.67±0.00
Tasa de crecimiento específico (SGR) %	1.09±0.00	0.73±0.03	0.75±0.00
Factor de condición (FC)	3.6±0.14	3.7±0.11	3.7±0.07

Nota. Recuperado de Adaptación de juveniles de Vieja colorada (*Cichlasoma festae*)

a la cría en condiciones experimentales controladas por Rodríguez et al. (2014).

Desarrollo de dietas

Los aspectos relacionados a la biología básica de las especies como la nutrición y alimentación han recibido muy poca atención, por esta razón se desconocen los requerimientos nutricionales en muchas especies (Espinosa et al., 2019). Esto conlleva a que alimentos formulados para peces de consumo como las tilapias y truchas sean usados en la alimentación de peces ornamentales, causando un desbalance de requerimientos nutricionales entre especies (Garzón & Espinosa, 2019).

Los peces consumen una gran variedad de alimentos y muestran diferentes hábitos alimenticios. Según la naturaleza del alimento ingerido, se pueden diferenciar tres categorías: herbívoros, Carnívoros y Omnívoros. En condiciones naturales los peces eligen los alimentos según sus características como: estructura, su movilidad, tamaño de partícula, color, sabor, olor y disponibilidad, también alcanzan balancear su dieta con los alimentos que mejor satisfacen sus necesidades nutricionales y rara vez se observan señales de deficiencias de nutrientes (Garzón & Espinosa, 2019).

El alimento de acuerdo a su composición nutricional se compone de agua, ceniza bruta, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y otros extractos solubles libres de nitrógeno los cuales se ingieren y digieren en el tracto digestivo y se absorben por el proceso de nutrición. De acuerdo al valor de nutrientes de los alimentos que necesita cada especie es importante conocer el contenido de ingredientes y su digestibilidad (INATEC, 2016).

El alimento vivo en la acuicultura actualmente se cuenta con una gran variedad de organismos ya que poseen un alto valor nutritivo, gran disponibilidad, fácil reproducción, distintos tamaños, cuerpo blando, entre ellos se encuentran especies como: *Artemia*

franciscana, *Daphnia pulex*, *Eisenia foetida*, *Spirulina sp.*, *Moina macrocopa*, *Brachionus plicatilis* y *Tubifex tubifex* (Tabla 4). Las características que posee el alimento vivo son muy viables para las especies ya que proporciona micro y macronutrientes, presentan un adecuado balance de aminoácidos y ácidos grasos esenciales beneficioso para un adecuado desarrollo cuando los peces lo consumen, este alimento mantiene sus características nutritivas durante periodos largos (Garzón & Espinosa, 2019).

Tabla 4

Análisis proximal y los valores energéticos de organismos más utilizados como alimento vivo para el cultivo y reproducción de peces ornamentales

Alimento natural	MS%	PC	Lípidos	EC (Kcal/Kg)
Fitoplancton	14-22	17-31	4-10	2200-3800
Rotíferos	11,2	64,3	20,3-10	4900
Artemia	11	61,6	19,5	5800
Insectos	23,2	55,9	18,6	5000

Nota. MS: Materia seca, PC: Proteína cruda, EC: Energía cruda. Recuperado de Aspectos nutricionales de peces ornamentales de agua dulce por (Garzón y Espinosa, 2019). Revista politécnica.

La formulación de los alimentos artificiales tiene como fin mezclar ingredientes en diferentes cantidades y calidades nutricionales para permitir obtener dietas completas que permitan suplir las necesidades nutricionales de los animales (Espinosa et al., 2019). Para la formulación es indispensable conocer los siguientes factores: especie con la que se va a trabajar, fase de desarrollo de la especie, fisiología digestiva, hábitos de alimentación y la composición de las materias primas a usar; así como también se debe tener presente las propiedades físicas de los alimentos como el tamaño de partícula, su textura, color y la flotabilidad o hundimiento del mismo (Garzón & Espinosa, 2019).

En la actualidad las dietas comerciales son elaboradas con menos del 10% de humedad y se encuentran en forma de polvo o pellets esto depende de la etapa productiva del animal, estos alimentos tienen la ventaja de que pueden ser almacenados por un largo tiempo y pueden ser preparados para satisfacer los requerimientos de la especie dependiendo de la etapa productiva de interés (Garzón & Espinosa, 2019). La tabla 5 hace referencia a los requerimientos nutricionales en diferentes etapas de desarrollo y el hábito alimenticio.

Tabla 5

Requerimientos nutricionales en las diferentes etapas de desarrollo y el hábito de alimentación en peces ornamentales

Etapa de desarrollo	PC%	Lípidos %
Alevines	>35	8
Juveniles	>25	5
Reproductores	>30	5
Hábito de alimentación		
Carnívoros	45	3-6
Herbívoros	15-30	1-3
Omnívoros	35-42	2-5

Nota. PC: Proteína cruda. Recuperado de *Aspectos nutricionales de*

peces ornamentales de agua dulce por (Garzón y Espinosa, 2019).

Revista politécnica.

Microbioma Intestinal

El término se refiere al conjunto de microorganismos comensales autóctonos (nativos) que coexisten dentro de un huésped sin causar ningún daño al mismo, donde se encuentran bacterias, virus, hongos, protozoos y hasta arqueas, estos microorganismos son capaces de colonizar la superficie epitelial del intestino del hospedero y alóctono cuando los microorganismos presentes en el medio circundante no logran permanecer dentro del intestino

(Puello et al., 2018); el número de estos microorganismos es infinita que llegan a superar el número de células propias de su huésped (entre 10 y 100 veces más) (Pérez ,2020).

El desarrollo de la microbiota intestinal en los animales acuáticos, está determinada por el entorno al contacto con el agua circundante. El intestino de los peces tiene la característica de ser colonizado por bacterias anaerobias facultativas y la variación poblacional de microorganismos dependerá del tipo de dieta ingerida, la secreción hormonal, la absorción de nutrientes, la acción y aparición de proteínas, la presencia de enzimas digestivas, la edad, la ubicación geográfica, los medicamentos utilizados, etc (Puello et al., 2018). En los peces de agua dulce el tracto gastrointestinal se caracteriza por ser un nicho ecológico que favorece el desarrollo de grandes comunidades microbianas, tanto poblaciones de microorganismos benéficos como de patógenos; las que más abundan son las que habitan en el medio que los rodea (Puello et al., 2018). Existen variaciones de las comunidades que están en el medio ambiente y que influyen de manera determinante en los géneros y en las especies que se puedan encontrar en la microbiota intestinal (Puello et al., 2018).

Las principales bacterias colonizadoras son anaerobias, aerobias y anaerobias facultativas obligadas; alojan una estimación aproximada de 10^7 a 10^{11} bacterias/g de contenido intestinal que comprenden los Phylum Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Clostridia, y Verrucomicrobia, de los cuales Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes representan hasta 90 % de la microbiota intestinal (Pérez, 2020).

Existen estudios microbiológicos del tracto gastrointestinal en los peces los cuales han evidenciado una gran variedad y diversidad de poblaciones bacterianas. En los peces de agua dulce los géneros dominantes corresponden a *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Plesiomonas*,

Micrococcus, Acinetobacter, Clostridium y algunos géneros de la familia Enterobacteriaceae (Puello et al., 2018).

Métodos de obtención del microbioma

Al explorar la microbiología intestinal de los peces se utilizan métodos basados en cultivos que subestiman enormemente la diversidad de estas comunidades, ya que menos del 10% de las bacterias pueden ser aisladas y cultivadas bajo condiciones de laboratorio (Amann et al., 1995). Recientemente se han aplicado métodos de cultivo molecular independientes al estudio de las comunidades microbianas que colonizan el intestino de los peces, dichos métodos son dirigidos a explorar la diversidad microbiana en diferentes ecosistemas (Valladares, 2016).

Los métodos de huella digital del ADN se han utilizado ampliamente para comparar la diversidad bacteriana de las comunidades que colonizan el tracto gastrointestinal de los peces. Estos métodos incluyen el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción terminal (T-RFLP) (Fjellheim et al., 2011) y la electroforesis de gel de gradiente de desnaturalización (DGGE).

Las técnicas se basan en la amplificación PCR dirigida de regiones variables que son exclusivas de especies o cepas bacterianas. En general, estas técnicas son bastante rápidas de realizar, relativamente baratas, y permiten un análisis de medio a alto rendimiento (Feria et al., 2019). Sin embargo, los resultados obtenidos con estos métodos son más cualitativos que cuantitativos y, en su mayor parte, informan sobre la complejidad de las comunidades, pero no sobre las unidades taxonómicas operativas específicas (OTU), que constituyen cada comunidad (La DGGE permite un análisis más detallado para identificar OTU específicas, pero este enfoque tiene un bajo rendimiento) (Donaire et al., 2017).

Un enfoque más comprensivo e independiente para obtener una diversidad completa presente en una muestra, es secuenciar el conjunto de genes de ARNr bacterianos 16S. La taxonomía bacteriana depende en gran medida de la secuenciación del gen del ARNr 16S, que se ha convertido en un método preciso para la identificación bacteriana rutinaria (normalmente se utiliza un punto de corte conservador de 97% de similitud de secuencia o superior para atribuir un aislado desconocido a una especie conocida) (Rodríguez et al., 2019). Los primeros esfuerzos incluyeron la generación de bibliotecas de clones 16S seguidas por la secuenciación de clones individuales utilizando la secuenciación de Sanger (García et al., 2016).

Importancia del microbioma

La metagenómica es un estudio evolutivo a nivel molecular que ha surgido como una herramienta en el entendimiento de complejas comunidades microbianas y víricas (Sala, 2017), este estudio abre paso a campos nuevos para obtener secuencias del genoma de diferentes microorganismos, extrayendo y analizando el ADN de forma global con el beneficio de tener un alto rendimiento y bajo costo ya que, se tiene la posibilidad de secuenciar en forma directa los genomas de microbios sin la necesidad de cultivarlos (García, 2016).

El estudio del microbioma identifica la abundancia y riqueza de microorganismos presentes en animales, para comprender la función que cumplen las poblaciones bacterianas y el papel que desempeñan en el medio donde se encuentran (Soriano, 2018). Los conocimientos sobre el mundo microbiano de especies podrían contribuir en la incorporación de programas de sanidad para la detección de agentes patógenos que provocan enfermedades o tasas de mortalidad en el hábitat, generar estudios acerca de cepas benéficas logra obtener ventajas en la producción de especies por medio del conocimiento de su función metabólica (Sala, 2017).

En el microbioma intestinal se encuentran comunidades que se pueden modificar mediante estudios para mejorar la salud del huésped, un requisito previo para este enfoque es la caracterización del microbioma intestinal de las especies de interés. Factores como la genética del huésped, el medio ambiente y la nutrición contribuyen a la composición del microbioma intestinal en vertebrados (Sala, 2017).

En acuicultura el estudio de las comunidades microbianas todavía está en fase inicial de desarrollo esta práctica en la última década toma gran popularidad como herramienta científica muy prometedora, pero en acuicultura se encuentra subutilizada. Realizar estudios sobre diversidad microbiana es algo comprometedor en cualquier actividad agropecuaria ya que, su conocimiento permite el uso y manipulación de estas comunidades para mejorar condiciones de cultivo. (Vargas & Martínez , 2015).

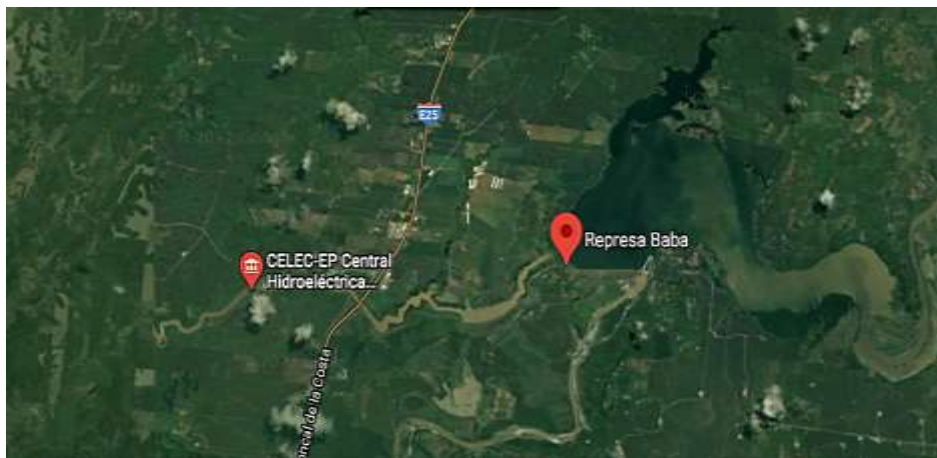
Capítulo III

Materiales y Métodos

Ubicación y características del área de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo con especímenes originarios del embalse del Proyecto multipropósito Baba, ubicada en el cantón Buena Fe, provincia de Los Ríos, geográficamente ubicado aguas abajo de la confluencia de los ríos Baba y Toachi (Anuario hidrológico, 2007), entre los paralelos 00° 14' S, 02° 27' S y cubre un área de 34.000 Km² (Tapia, 2012), la provincia se encuentra en la zona climática tropical monzónica, presenta una precipitación de 1867mm y una temperatura media de 25 grados centígrados (Sasso, 2009) (Figura 4).

Los ensayos de laboratorio fueron llevados a cabo en Laboratorio de Agrobiotecnología de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, Hacienda El Prado, ubicado en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando.

Figura 4*Ubicación geográfica del Proyecto multipropósito Baba*

Nota. Recuperado de Google Maps, 2020.

Obtención de Especímenes

El presente estudio fue parte del macro proyecto “Perfiles esteroidales de *A. rivulatus* y *C. festae* con fines de reproducción en el embalse del Río Baba” financiado por la convocatoria INEDITA - SENESCYT. Este proyecto contó con la autorización MAE N° 0017 -18 IC- FAUNA para la recolección y estudio de 160 peces de las dos especies. Se colectaron individuos de la especie Vieja azul con una longitud entre 18 y 24 cm y un peso entre 219 y 230 g, al igual que en la especie de Vieja roja con una longitud entre 20 y 25 cm y un peso entre 180 y 220 g. Los peces fueron colectados en el embalse del Proyecto multipropósito Baba con la ayuda de atarrayas. Además, fueron clasificados según las características morfológicas externas y posteriormente fueron sacrificados para la colección de muestras para los siguientes procedimientos.

Figura 5

Identificación y selección de las especies Vieja roja y azul para su respectivo análisis



Nota. Abreviatura HR: Hembra roja, RM: Roja macho, AH: Azul hembra y AM: Azul macho.

Identificación taxonómica molecular de especies***Obtención de la Muestra***

Se seleccionaron al azar dos individuos de cada una de las especies clasificadas, y se les extrajo una pequeña porción de la aleta dorsal con la ayuda de pinzas y tijeras previamente esterilizadas, se colocó las muestras obtenidas en tubos con etanol absoluto y se rotulo respectivamente. Las muestras fueron transportadas en frio hasta el Laboratorio de Agrobiotecnología, IASA-I.

Extracción de ADN

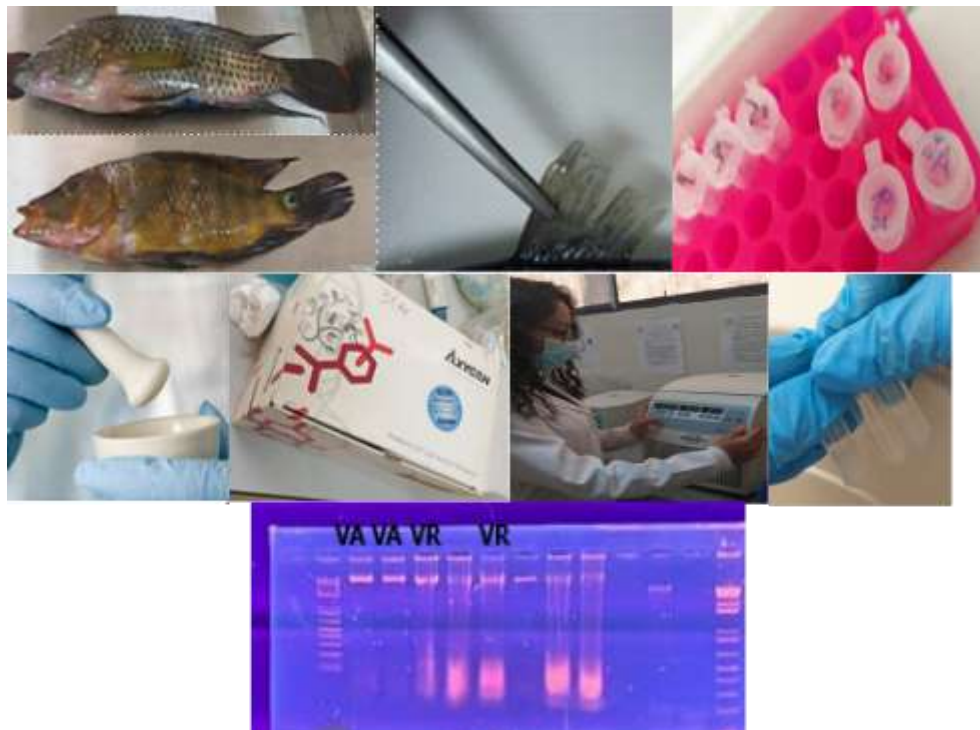
En el laboratorio se tomó 20 mg de cada muestra de aleta, se las transfirió a un mortero y se las llevó a enfriar a -80°C en un crío congelador por 10 min. Posteriormente se sacó las

muestras del congelamiento e inmediatamente se molieron hasta formar un polvo fino. Después la extracción de ADN se llevó a cabo con el kit AxyPrep Multisource Genomic Miniprep DNA (Axygen®, USA) al añadir al pulverizado 350 µl PBS 1X y calentar el mortero a 56°C. Se recogió 350 µl del homogenizado y se transfirió a un microtubo de 2 ml. Luego se colocó 20 µl de proteinasa K y 150 µl de tampón C-L (Lisis), se mezcló agitando en un vórtex por 1 minuto, se incubó a 56 °C durante 1 hora. Los demás procesos se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo de Muestras Animales del kit de extracción, hasta obtener el ADN purificado. La calidad y cantidad del ADN fue evaluado por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%.

Figura 6

Procedimiento para la obtención de muestras y extracción de ADN de aletas de las especies

Vieja roja y Vieja azul



Nota. Para las muestras en gel de agarosa: VA. Aletas Vieja azul, VR. Aletas Vieja roja.

Secuenciación de gen Cytb

El ADN obtenido de buena calidad fue enviado al laboratorio perteneciente a Macrogen Inc., bajo la gestión de la empresa Analítica NOGAN S.A. (TestGEN). En él se amplificó mediante el gen mitocondrial que codifica para el citocromo b (Cyt b), con el uso de Primers Universales para este gen en peces: FishcytB-F (5' ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC 3') y TruccytB-R (5' CCGACTTCCGGATTACAAGACCGCG 3') (Sevilla et al., 2007). El producto PCR de aproximadamente 1000bp se secuenció por el método Sanger en el equipo Abi3730xl (Thermo Fisher scientific, USA), usando los mismos Primers para el gen CytB. Una vez obtenidas las secuencias fueron analizadas bioinformáticamente por el Flujo de Trabajo provisto por TestGEN en donde se realizó una limpieza de las secuencias forward y reverse, se ensamblaron las secuencias complementarias para obtener una secuencia consenso de cada muestra mediante los softwares: Bioedit versión 7.2.5 Tom Hall y Chromas versión 2.6.6. Las inconsistencias del ensamble fueron curadas manualmente, y la secuencia final de cada muestra fue comparada con la base de datos mundial GenBank de NCBI mediante el algoritmo BLAST versión 2.2.25 (Zhang et al., 2004). Para determinar taxonómicamente la identidad de las muestras se seleccionó el alineamiento con la más alta similitud y el valor de puntuación (SCORE) mayor en cada muestra.

Análisis del microbioma

Obtención de la Muestra

Se seleccionaron tres individuos de cada especie, los individuos fueron escogidos al azar de los peces que previamente se extrajeron del ambiente natural. A estos individuos se les extrajo el intestino anterior, al realizar un corte rectangular en un lado del animal; empezando desde el orificio anal, hasta la cercanía del opérculo; y el corte fue de forma perpendicular desde el orificio anal hacia arriba, y en la cercanía del opérculo hacia arriba. Se extrajo con la ayuda de una pinza todo el intestino, y se cortó un pequeño pedazo de la parte anterior del mismo, la muestra se colocó en un tubo con etanol absoluto y se mantuvo en refrigeración hasta el transporte al laboratorio en donde fueron mantenidas a -20°C.

Extracción de ADN

Para la extracción se empleó el kit comercial DNeasy® PowerSoil® Pro (Qiagen, USA), se colocó el intestino en los tubos de homogenización y los mismos fueron puestos en el equipo de disrupción Bead Ruptor elite (OMNI international, USA). Posteriormente se realizó la extracción siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN fue cuantificado por fluorometría con el Kit Qubit™ dsDNA HS Assay en el fluorómetro portátil Qubit™ (Invitrogen, USA), también se evaluó su calidad mediante electroforesis horizontal.

Figura 7

Procedimiento para la obtención de muestras y extracción de ADN de intestinos de las especies Vieja roja y Vieja azul



Nota. Para las muestras en gel de agarosa: GVA. Intestinos de Vieja Azul, GVR. Intestinos de Vieja roja.

Secuenciación

Esta etapa se gestionó por TestGen (Análítica NOGAN S.A., Quito, Ecuador) para los envíos y secuenciación a MACROGEN INC. (Seul, Korea). Se realizó una secuenciación masiva de la porción hipervariable V3-V5 del gen 16s rRNA, para lo cual se utilizó la librería de 16S rRNA con el kit Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index V2 y se secuenció con plataforma MiSeq (Illumina, USA). Generando datos de secuencias pareadas (Ida y Reversa) con una longitud promedio de 300bp. En la siguiente figura 8 se muestra el flujo de trabajo de la secuenciación.

Figura 8

Flujo de trabajo de la secuenciación NGS por plataformas Illumina

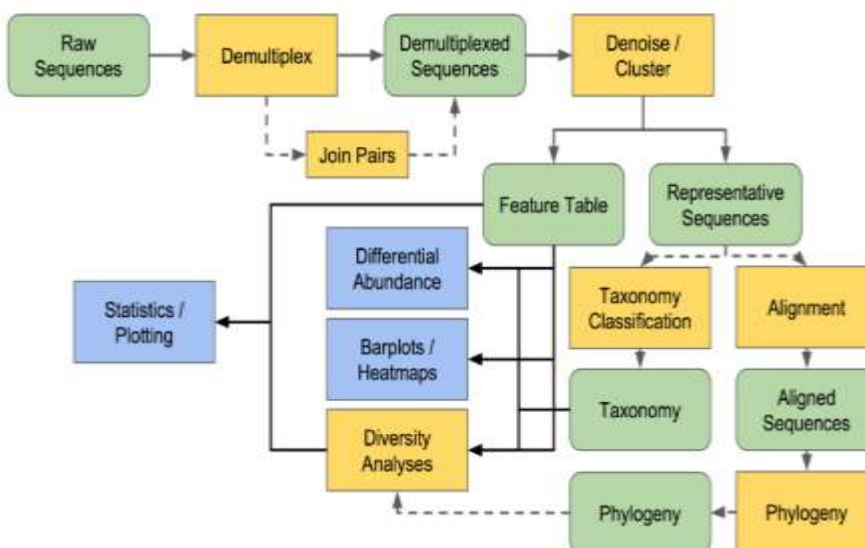


Análisis Bioinformático de Secuencias

Las secuencias fueron analizadas en el Software QIIME 2, en el cual se realizó una depuración de secuencias con mala calidad, se eliminaron quimeras y secuencias no concordantes. Posteriormente se clasificaron los OTUs filogenéticamente y se realizó un análisis de Alfa Diversidad, en donde se generó Curvas de Rarefacción y Tablas de la cantidad de OTUs e Índice de diversidad de Shannon. Finalmente se comparó las secuencias de OTUs con la base de datos GreenGenes para presentar los perfiles taxonómicos del microbioma en los niveles Filum, Clases, Orden, Familia, Género y Especie. Los datos y tablas generadas por el flujo de trabajo (Figura 9) fueron ingresadas en Microsoft Excel para generar gráficos comprensibles.

Figura 9

Flujo de trabajo estandarizado por la guía de uso del programa QIIME 2



Análisis Estadístico

Se realizó una comparación de los microbiomas entre las dos especies de Viejas para poder asociar sus comportamientos alimenticios con dicha composición. Se compararon los parámetros de riqueza (número total de OTUs), diversidad (Índice de Shannon), abundancia relativa y las composiciones de los grupos más abundantes dentro de los niveles taxonómicos estudiados. Para ello se usó una comparación de medias LSD Fisher al 5%.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

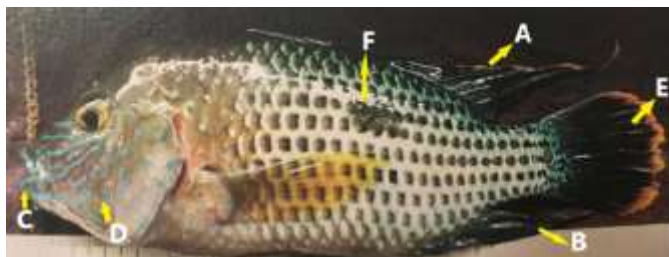
Identificación taxonómica de las especies

En el muestreo de la Cuenca alta del río Guayas se capturaron 160 peces según la autorización MAE N° 0017 -18 IC- FAUNA, de los cuales se seleccionaron cinco peces para *A. rivulatus* y 5 para *C. festae*. Estas muestras presentaron características fenotípicas únicas para cada especie y la secuenciación confirmó la identidad de las especies como *Andinoacara rivulatus* para Vieja Azul y *Cichlasoma festae* para Vieja Roja o colorada.

Identificación Morfológica

En los especímenes capturados de Vieja azul se observó en la base de la cabeza una coloración azul intensa en forma de rayas y cabeza relativamente corta, una protuberancia en la parte superior característica muy común en machos adultos, cuerpo robusto moderadamente profundo, no presentaban aleta adiposa. Algunos peces presentaron una aleta caudal redondeada y otros en punta, tenían grandes labios, y una mancha negra en la mitad de su cuerpo, que terminaba al final de la aleta pectoral, la aleta dorsal era larga continua (Figura 10).

Estas características morfológicas concuerdan con la información registrada en la bibliografía para la especie esperada, *Andinoacara rivulatus* (Nugra et al., 2018). Las distintas variedades de esta especie se diferencian por el color del ribete de las aletas y en Ecuador predomina el ribete plateado adoptando el nombre de “silbersuam”, característica encontrada en los peces capturados (Günther, 1860). Cabe aclarar que la presencia de peces con aleta caudal con diferente forma se debe al dimorfismo sexual, encontrándose machos con aleta en punta y hembras con aletas redondeadas (Prado et al., 2015).

Figura 10*Especimen de Vieja azul*

Nota. **A.** Aleta dorsal larga y continua, **B.** Ribete de las aletas plateado, **C.** Grandes labios, **D.** Coloración azul intensa en forma de rayas en la base de la cabeza, **E.** Aleta dorsal, **F.** Mancha negra en la mitad de su cuerpo.

Los especímenes capturados de Vieja Roja presentaron una cabeza grande en relación con su cuerpo, las escamas de la región anterior de la cabeza tenían un tamaño grande, en su boca se observó pequeños dientes caninos. Se registró la presencia de 9 bandas negras sobresalientes en su cuerpo alternadas con bandas pálidas o rojizas y fuertes espinas tanto en la aleta dorsal como en la anal. Escamas en la línea lateral de 26 a 27, una mandíbula inferior ligeramente más proyectada, pedúnculo caudal más alto que largo, áreas blandas de las aletas dorsal, caudal y anal de la misma coloración de las partes pálidas o rojizas (Figura 11). Todas estas características de las especies capturadas de Vieja roja coincidían con la literatura de *Cichlasoma festae* (Prado et al., 2015).

Figura 11

Espécimen de Vieja roja



Nota. **A.** Mandíbula inferior, **B.** 9 bandas negras, **C.** Pedúnculo caudal, **D.** Aleta anal.

La especie encontrada en el estudio, por sus características morfológicas externas suele confundirse con *Cichlasoma ornatum*, sin embargo, difieren en el conteo de escamas en la línea lateral, *C. festae* posee 26-27 escamas en la serie mediana y *C. ornatum* de 30-32 escamas (Boulenger, 1899; Laaz et al., 2009; Glodek, 1978). Cabe mencionar que la ubicación taxonómica de *C. ornatum* es todavía incierta, pertenece a la tribu Heroini, pero se mantiene como una especie *Incertae Sedis* (incapacidad para ubicar exactamente un taxón) de *Cichlasoma* en espera de una revisión de los cíclidos de este grupo (Kullander, 2003).

Figura 12

Especie Cichlasoma ornatum



Fuente (Argüello, 2017).

Identificación Molecular

Se encontró que para las muestras provenientes Vieja azul (VA01 y VA02) la más alta similitud de secuencias fue con la especie *Andinoacara rivulatus*, concordando con el resultado de la comparación morfológica y lo esperado para este estudio. Ambas muestras se alinearon con mayor similitud a la secuencia *Andinoacara rivulatus* mitochondrial DNA complete genoma, con un porcentaje de identidad del 99.64 % para VA01 y 99.63% para VA02 (Tabla 6) y (ANEXOS 1 y 3).

En el análisis de secuencias se encontró que el número de alineaciones con alta similitud (Hits) correspondientes con el género *Andinoacara* fue de 99 Hits, de los cuales 34 fueron correspondientes con *A. rivulatus* que además presentan los valores de puntuación (Score) más altos, *A. coeruleopunctatus* con 18 hits y los hits restantes estaban distribuidas en varias especies del género. Inesperadamente se encontró un Hit con la especie *Bujurquina zamorensis* con una puntuación de (1956 y 1919), y un porcentaje de identidad de (99,44% y 99,43%)

(ANEXOS 2 y 4). Lo que indica la cercanía filogenética *B. zamorensis* con el género *Andinoacara*, al pertenecer al mismo Clado, además que ambos comparten ciertas similitudes morfológicas y comportamentales (Kullander, 2003; Musilová et al., 2009).

Para las muestras provenientes de Vieja roja (VR01 y VR02) la más alta similitud de secuencias fue con la especie *Cichlasoma festae* conocida como *Mesoheros festae*, concordando también con el resultado de la comparación morfológica y lo esperado para este estudio. Se encontró que para la muestra VR01 la secuencia más similar con un porcentaje de identidad de 100% fue *Cichlasoma festae* stri-15028 y para la muestra VR02 de 99.91% *Cichlasoma festae* isolate E061 (Tabla 6) y (ANEXOS 5 y 7).

Se encontró además que las muestras de Vieja roja se alinearon con especies de la subfamilia de Cichlasomatinae. Dentro de esta el género *Mesoheros* o *Cichlasoma* tuvo el mayor número de Hits con 60, de los cuales 24 corresponde *Mesoheros festae*, que a su vez tienen la puntuación y similitud más altas, seguido de *Mesoheros ornatus* y *Mesoheros atromaculatus* (ANEXO 6 y 8). Esto indica que esta subfamilia tiene una relación altamente cercana.

Hay que aclarar que *Mesoheros festae* (Boulenger, 1899) es homónimo de '*Cichlasoma festae*'. (Regan, 1905) en un intento temprano de clasificar estos peces, dividió ese género en una serie de grupos informales o secciones a las que aplicó nombres de grupos genéricos. Los nombres que propuso Regan (con algunas modificaciones posteriores) han sido ampliamente empleados, a veces denotando géneros discretos y otras veces diseñando subgéneros o grupos informales dentro de *Cichlasoma*.

Tabla 6*Identificación taxonómica de las especies vieja azul y vieja roja*

Código	Identidad	Acceso NCBI	Cobertura	% Identidad
	<i>Andinoacara rivulatus</i> mitochondrial			
VA01	DNA, complete genome	LC009435.1	98%	99.64%
	<i>Andinoacara rivulatus</i> mitochondrial			
VA02	DNA, complete genome	LC009435.1	100%	99.63%
	<i>Cichlasoma festae</i> stri-15028			
VR01		AY843351.1	98%	100%
	<i>Cichlasoma festae</i> isolate E061			
VR02		HQ197723.1	99%	99.91%

Nota. Código VA01. Muestra #1 de aleta dorsal de vieja azul, VA02. Muestra #2 aleta dorsal de vieja azul, VR01. Muestra #1 de aleta dorsal de Vieja roja y VR02. Muestra #2 de aleta dorsal de Vieja roja.

Caracterización de la Microbiota Intestinal

Diversidad Alfa del Microbioma

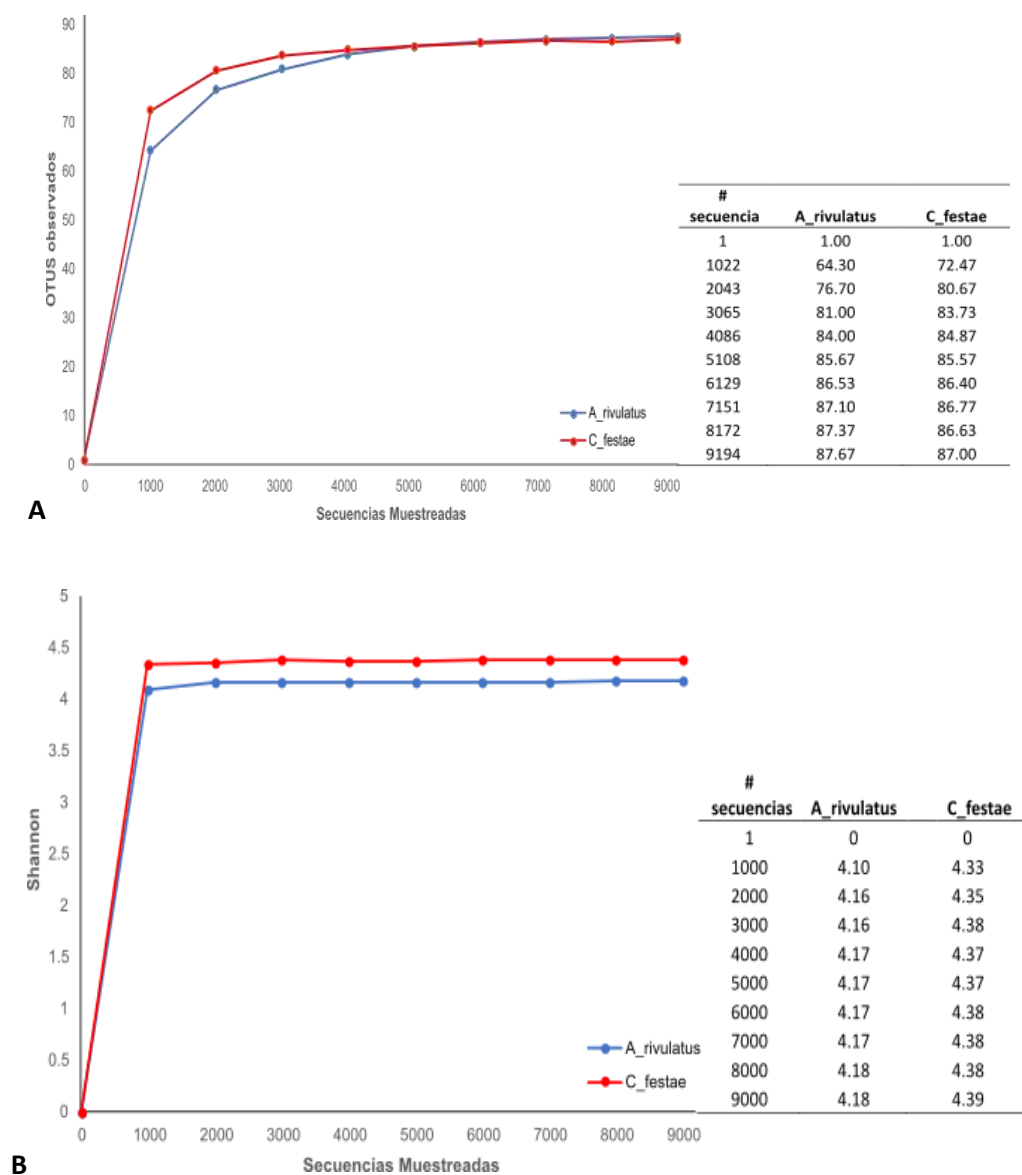
La diversidad alfa hace referencia a la cantidad (riqueza) de especies que están presentes en un determinado ecosistema que se encuentra en condiciones homogéneas (Rodríguez, 2006). Mediante el software QUIIME II se generó datos para la elaboración de curvas de rarefacción, técnica de evaluación de la diversidad en la que se muestrea sin reemplazo un determinado número de secuencias de cada muestra biológica y se cuantifica dentro de estas los índices de alfa diversidad. Estos muestreos de secuencias se repiten aumentando cada vez el número de secuencias, y volviendo a calcular los índices. De esta manera se pueden generar curvas, para analizar y comparar como aparece la riqueza en el

microbioma dentro de una muestra biológica. Para el presente estudio se analizaron dos índices de diversidad: Número Total de OTUs e Índice de Shannon (Figura 13).

Figura 13

Gráfico de rarefacción para el número de OTUS (riqueza) en las dos especies de

estudio, a una profundidad de lectura máxima de aproximadamente 9000 secuencias



La riqueza absoluta del microbioma fue medida por la cantidad de Unidades taxonómicas operativas (OTUs) diferentes presentes en cada muestra, y como un promedio para cada especie de pez. En la curva de rarefacción para este parámetro se encontró que *A. rivulatus* y *C. festae* tuvieron un comportamiento muy similar de las curvas, alcanzó un valor cercano máximo número de OTUs a las 5000 secuencias, lo que indica que se ha podido cubrir la mayor parte de la diversidad que pueda presentarse en las muestras biológicas. Al final del muestreo con 9000 secuencias se obtuvo una biodiversidad amplia de bacterias con 87 OTUs en promedio para ambas especies (Figura 13A). Las curvas de cada muestra no mostraron una correlación asociada a la especie, razón por la cual al promediar los valores de cada especie fueron muy similares.

El número de OTUs es una medida absoluta y no toma en cuenta la abundancia de cada uno dentro de la población de estudio (Velasco, 2016), por ello es, conveniente analizar el índice de Shannon para las mismas cantidades de secuencias de muestreo. La curva obtenida para este índice confirmó la tendencia mostrada por el número de OTUs en donde se alcanzó a la máxima biodiversidad en un número bajo de secuencias (1000 secuencias), y se encontró una mayor separación entre los valores máximos que en el índice anterior, y siendo de mayor valor para *C. festae* a las 9000 secuencias muestreadas se alcanzó un valor máximo del Índice de Shannon de 4.18 para *A. rivulatus* y 4.39 para *C. festae*. Sin embargo, a pesar de que para la última especie es un valor mayor, la diferencia no llegó a ser significativa (Tabla 7), lo que muestra que ambas especies comparten una riqueza de especies muy similar.

Tabla 7

Índices de diversidad para las comunidades de bacterias presentes en el intestino de A. rivulatus y C. festae

Especie	Repetición	OTUs	Shannon
A. rivulatus	GVA01	49	3.943
	GVA02	126	4.345
	GVA03	88	4.253
		87,67 ± 22,23 ^a	4,18 ± 0,12 ^a
C. festae	GVR01	92	5.023
	GVR02	64	3.346
	GVR03	105	4.786
		87,00 ± 12,23 ^a	4,39 ± 0,52 ^a

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Abundancia Taxonómica

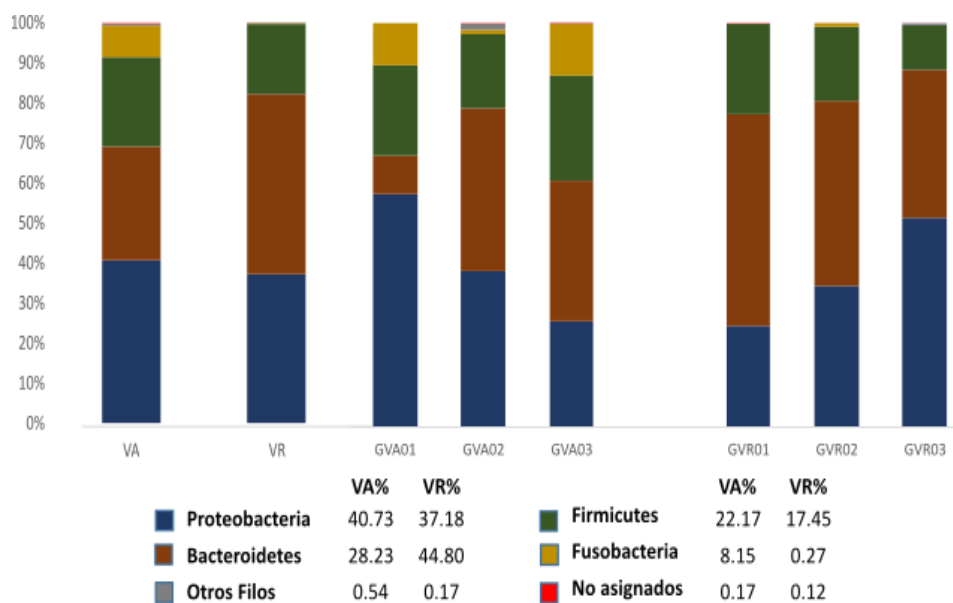
Nivel Filo. En primer lugar, hay que mencionar que prácticamente la totalidad de las secuencias estudiadas pertenecen al Reino Bacteria, y no se encontró especies del Reino Archea en la muestra intestinal de los peces estudiados, razón por la cual se mencionan los resultados desde el nivel taxonómico Filo.

Los resultados muestran que los Filos predominantes en todas las muestras obtenidas son Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes. Sin embargo, su composición no fue significativamente diferente entre las dos especies de peces estudiadas, al igual que todos los filios encontrados ($p > 0.05$). A pesar de esto, se notó una mayor presencia de Bacteroidetes en *C. festae* y por el contrario un aumento de Fusobacteria en *A. rivulatus* (Figura 14). Otros filum no mostraron tener una presencia notable dentro del microbioma de ambas especies ya que en conjunto representaron menos del 1%.

Estudios indican que los filos Proteobacteria, Fusobacteria y Firmicutes dominan el microbioma intestinal de la mayoría de las especies de peces estudiadas hasta la fecha, incluidas las marinas y las de agua dulce, representando hasta el 90% de las comunidades (Hennersdorf et al., 2016; Llewellyn et al., 2016). Las Proteobacterias son muy características en peces silvestres, produciendo enzimas extracelulares involucradas en la fermentación de carbohidratos y proteínas (Pérez et al., 2020). Mientras que los Firmicutes degradan la celulosa y fermentan varias fuentes de carbono (Kessel et al., 2011; Butt & Volkoff, 2019). Por otra parte, los Bacteroidetes son conocidos por presentar un metabolismo fermentativo y la degradación de oligosacáridos derivados de material vegetal y su aumento en *C. festae* puede estar asociado al consumo de plantas acuáticas (Pérez et al., 2020; Kessel et al., 2011; Prado et al., 2015).

Figura 14

Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Filo



Nota. VA: Vieja azul VR: Vieja roja.

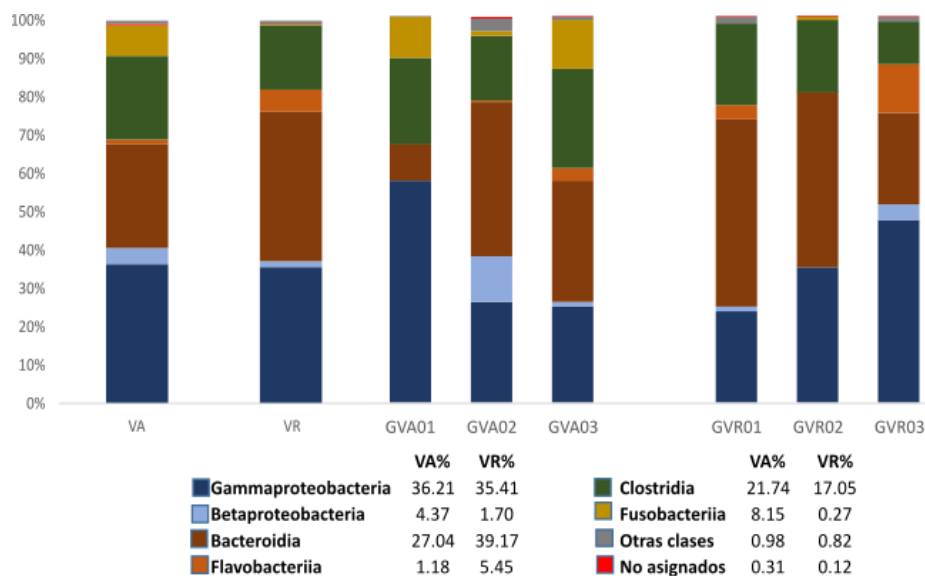
Las Fusobacterias son bacilos anaeróbicos gramnegativos que producen butirato, un ácido graso de cadena corta que a menudo es el producto final de la fermentación de carbohidratos. Lo que explicaría su mayor presencia en *A. rivulatus*, al tener hábitos omnívoros con tendencia herbívora en su ambiente natural, haciendo necesaria la presencia de este filum para metabolizar un aumento de ingesta de productos vegetales (Bennett & Eley, 1993; Ajila, 2019).

Nivel Clase. Dentro de las Proteobacterias encontradas en las especies de estudio, ambas presentan un dominio de la clase Gammaproteobacteria similar, mientras que el restante ocupó principalmente la clase Betaproteobacteria. Los Bacteroidetes en cambio estuvieron dominados por la presencia de la clase Bacteroidia y en menor medida la clase Flavobacteriia. Por otro lado, el filum Firmicutes estuvo dominado casi completamente por la clase Clostridia muy común en el intestino de peces y otros vertebrados (Pérez et al., 2020). En las clases representativas excepto Fusobacteriia (clase completamente dominante del filum Fusobacteria) y Bacteroidia, su presencia fue muy similar en ambas especies y estadísticamente las diferencias observables en las clases mencionadas no fue significativa.

Figura 15

Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies

Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Clase



Nota. VA: Vieja azul VR: Vieja roja.

Nivel Orden. En este nivel se observó que la clase Gammaproteobacteria está dominada por la presencia de dos órdenes principales Enterobacteriales y Aeromonadales; mientras que las Betaproteobacteria estuvieron representadas casi totalmente por el orden Neisseriales. En la clase Bacteroidia se encontró exclusivamente bacterias del orden Bacteroidales; y de igual manera los órdenes Flavobacteriales, Clostridiales y Fusobacteriales dominaron completamente las clases Flavobacteriia, Clostridia y Fusobacteriia, respectivamente.

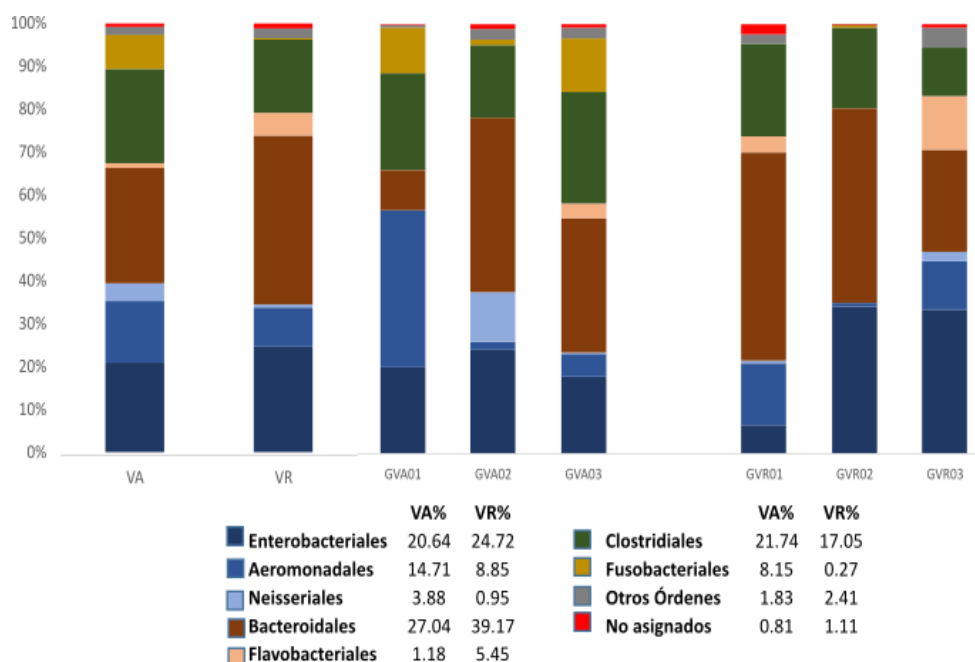
Se observó un aumento notorio de Neisseriales y Fusobacteriales en *A. rivulatus* en comparación con *C. festae*. Mientras que sucedió lo contrario en los Bacteroidales y Flavobacteriales en donde su cantidad fue evidentemente mayor en *C. festae*. Sin embargo,

estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El orden Neisseriales se han asociado con el metabolismo de proteínas y aminoácidos (alanina, aspartato, glutamato, arginina, prolina, glicina, serina y treonina) (Wei et al., 2018). Por otra parte, el orden Bacteroidales son bacterias anaerobias, productoras significativas de vitamina B12 en el intestino de los peces, descomponen polisacáridos y metabolizar sus azúcares, degradan moléculas complejas en el intestino del huésped (Kessel et al., 2011).

Figura 16

Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies

Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Orden



Nota. VA: Vieja azul VR: Vieja roja.

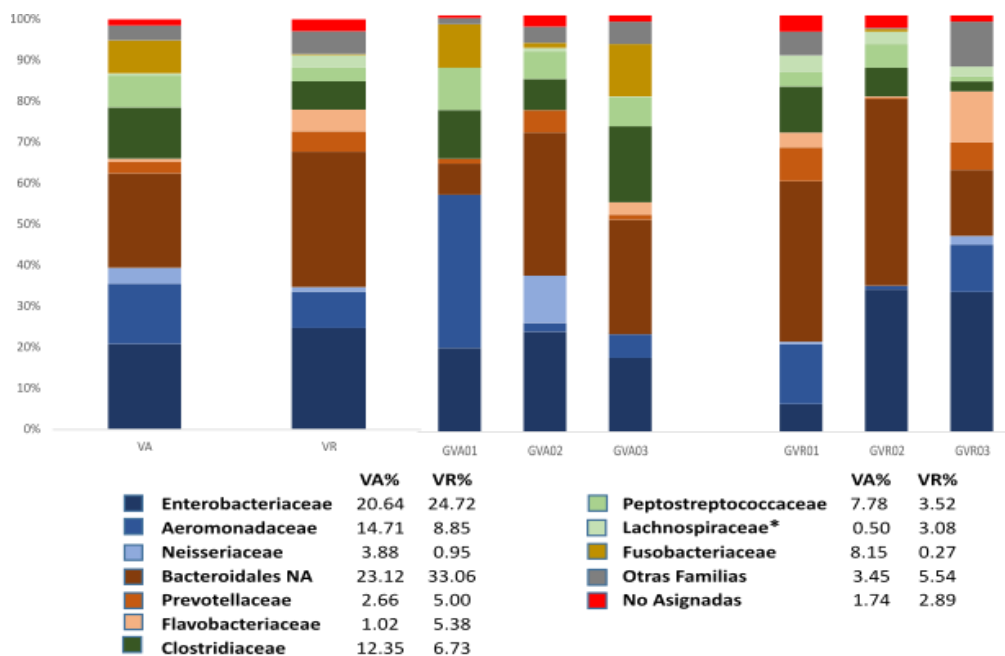
Nivel Familia. En este nivel taxonómico se pudo encontrar que tanto los órdenes Enterobacteriales, Aeromonadales, Neisseriales y Fusobacteriales estaban completamente representados por las familias Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae, Neisseriaceae y Fusobacteriaceae, respectivamente. El orden Flavobacteriales estuvo dominado casi en su totalidad por la familia Flavobacteriaceae. Mientras que los Clostridiales se vieron representados por las familias Clostridiaceae, Peptostreptococcaceae y Lachnospiraceae, siendo las dos primeras las más abundantes. Sin embargo, gran parte de los Bacteroidales no pudieron ser clasificados a este nivel taxonómico por la distancia entre sus secuencias y las familias de este orden, mientras el restante fue asignado como familia Prevotellaceae.

Respecto a la composición, se encontró que *A. rivulatus* presentó un aumento de las familias Fusobacteriaceae, Clostridiaceae, Peptostreptococcaceae y Aeromonadaceae en comparación con *C. festae*. Mientras el efecto contrario fue evidente en las familias Lachnospiraceae, Flavobacteriaceae y las especies del orden Bacteroidales No clasificadas. Sin embargo, solamente la diferencia de Lachnospiraceae fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Figura 17

Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies

Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Familia



Nota. * Muestra diferencias significativas, NA. No asignado, VA: Vieja azul, VR: Vieja roja.

(Li et al., 2018) menciona que las bacterias de la familia Fusobacteriaceae actúan en el metabolismo de los carbohidratos; para la familia Lachnospiraceae los autores (Eren et al., 2015) señalan que estas bacterias ayudan a degradar polisacáridos complejos a ácidos grasos de cadena corta que incluyen acetato, butirato y propionato que el huésped puede usar como energía.

Nivel Género. En primer lugar, en este nivel taxonómico se puede notar un incremento importante de la cantidad de OTUs no asignados tanto a niveles taxonómicos anteriores como al presente nivel, debido al aumento de la distancia filogenética de las secuencias de estas bacterias con las presentes en la base de datos utilizada para este estudio. Este efecto, puede deberse a la presencia de especies completamente nuevas en el microbioma, así como haplotipos aún no descubiertos de bacterias conocidas.

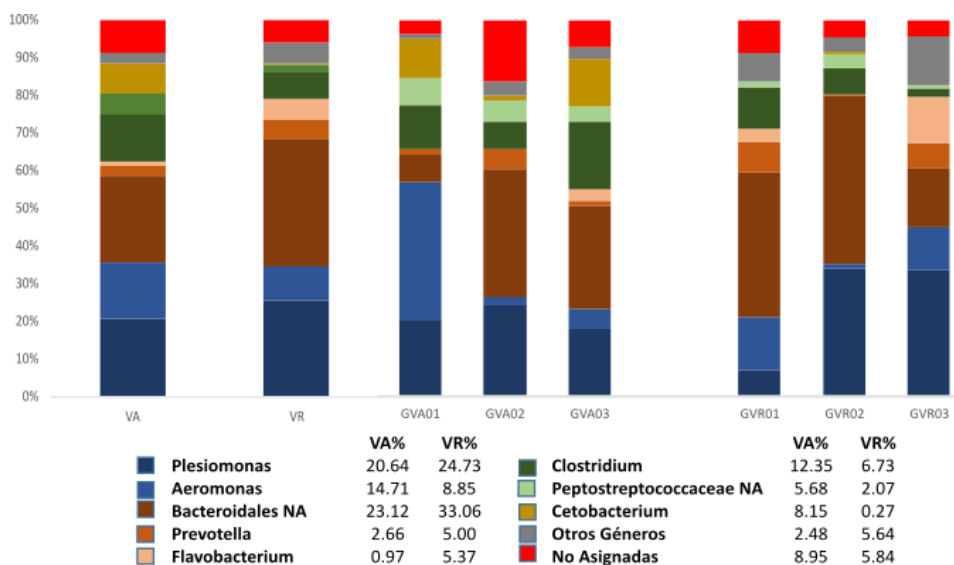
Las familias Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae, Prevotellaceae, Flavobacteriaceae, Clostridiaceae y Fusobacteriaceae fueron representadas exclusivamente o casi en su totalidad por los géneros Plesiomona, Aeromona, Prevotella, Flavobacterium, Clostridium y Cetobacterium, respectivamente. Mientras que las especies de familia Peptostreptococcaceae no pudieron ser asignadas a un género conocido. También hay que notar que familias que fueron relevantes como Lachnospiraceae y Neisseriaceae tuvieron mayor diversidad al dividirse en varias familias que en abundancia no son relevantes y fueron agrupadas dentro de “otras familias”.

Debido a la dominancia de un solo género en la mayor parte de las familias abundantes, la composición de la microbiota no varió a este nivel en comparación con el anterior. Las diferencias en la abundancia de cada género entre las especies de estudio son prácticamente igual a la diferencia que se encontró al nivel familiar, y de igual manera dichas diferencias no fueron significativas.

Figura 18

Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies Vieja

roja y vieja azul a nivel taxonómico Género



Nota. NA. No asignado, VA: Vieja azul VR: Vieja roja.

Las bacterias del género *Aeromonas* están presentes en peces de agua dulce y principalmente en especies de clima cálido, son celulolíticas con la capacidad de digerir materia vegetal y también son productoras de quitinasa, característica presente también en las bacterias del género *Flavobacterium*. Mientras el género *Clostridium* son bacterias versátiles al tener la capacidad de utilizar varios polisacáridos, como la celulosa, xilano, y hemicelulosa, que constituyen la parte significativa de las fibras vegetales (Wei et al., 2018; Pérez et al., 2020; Kessel et al., 2011). Estos géneros bacterianos al estar presentes en mayor medida en *A. rivulatus* le conferirían su capacidad de sobrevivir en dietas altas en fibras vegetales, en comparación con *C. festae* que es un animal con tendencias carnívoras (Prado et al., 2015).

Hay que recalcar que la presencia del género *Cetobacterium* ha sido importante en peces de agua dulce como el pez amazónico *Arapaima gigas* en la que su microbiota intestinal está dominada por este género, y al que *Oreochromis niloticus* (tilapia) y *Cyprinus carpio* (carpa), se ha relacionado a esta especie con la producción de vitamina B12, lo que indicaría una necesidad de este nutriente en la dieta de especies con *Cetobacterium* en su microbiota (Ramírez et al., 2018).

Nivel Especie. En este último nivel taxonómico, fue más evidente el aumento de OTUs no asignados como especies, y no es de extrañarse, ya que la amplia variedad microbiana alrededor del mundo apenas ha sido estudiada, por lo cual muchas especies aún no son asignadas taxonómicamente, además que no se puede excluir la posibilidad de que estén presentes especies aún no conocidas.

Otro problema para poder clasificar correctamente un OTUs en una especie es la longitud de secuencia y la variabilidad filogenética de la misma. Los métodos de secuenciación masiva para el estudio de comunidades suelen presentar secuencias cortas rondando los 300bp, por lo que se elige regiones hipervariables dentro de genes de estudio para clasificación filogenética, en este caso se usó la región V3 a V5 del gen 16s rRNA. Sin embargo, no tiene la misma resolución que el gen total, por esta razón, especies muy semejantes no pueden ser reconocidas debido a una redundancia en los resultados. Este efecto es evidente al no poder clasificar los OTUs presentes en los géneros *Aeromonas* y *Clostridium*, así como de otros niveles taxonómicos (Bacteroidales y Peptostreptococcaceae).

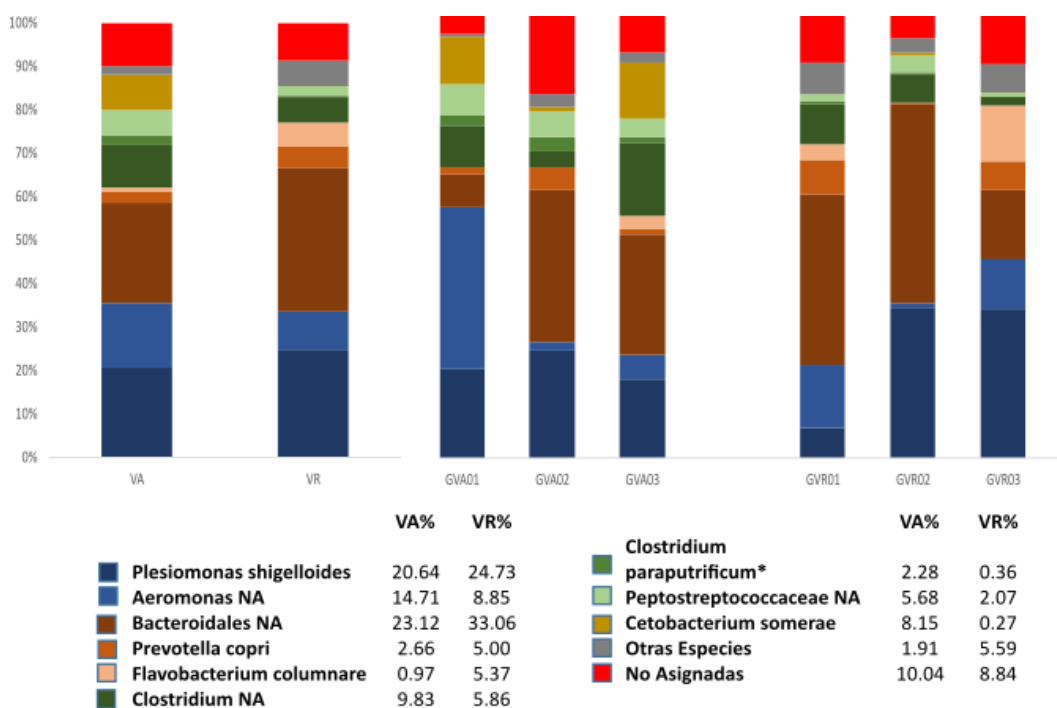
Para los géneros *Plesiomonas*, *Prevotella* y *Cetobacterium* las especies totalmente representativas fueron *P. shigelloides*, *Prevotella copri* y *C. somaerae*, respectivamente.

Mientras que parte del género *Clostridium* que sí pudo ser asignado fue representado con mayor abundancia por la especie *C. paraputrificum*, y para *Flavobacterium* la especie *F. columnare*.

Figura 19

Gráfico de barras de la composición del contenido y porción intestinal de las especies

Vieja roja y vieja azul a nivel taxonómico Especie



Nota. VA: Vieja azul VR: Vieja roja.

En general una de las especies con mayor importancia en el intestino de los peces, principalmente en las especies de agua dulce, es *Cetobacterium somerae*, esta especie de bacteria ha sido identificada en mayor cantidad, representan hasta el 94% del total como lo menciona (Llewellyn et al., 2016), esta especie puede inhibir el crecimiento de patógenos

potenciales, esta bacteria es micro-aerotolerante (organismo anaerobio), no formadora de esporas lo que dificulta al cultivar bajo condiciones de laboratorio, pero que justifica investigaciones adicionales sobre su función en el intestino del pez. Los autores (Kessel et al., 2011) mencionan que estas bacterias son bacilos gramnegativos anaeróbicos que puede realizar metabolismo fermentativo de péptidos y sintetizan altas cantidades de vitamina B12. Los autores (Rossi et al., 2020) sugieren que las especies de peces que contienen *C. somerae* no necesitan una dieta suplementada con vitamina B12 y en *A. rivulatus* la presencia de esta especie de bacteria es evidente, por otro lado, aquellas especies que no tienen *C. somerae* se recomienda la suplementación de esta vitamina, ya que, sin ella en los peces genera un bajo apetito y bajo crecimiento.

Por otro lado, para la especie de bacteria *Plesiomonas shigelloides*, (Pérez et al., 2020) señalan que esta especie de bacteria puede ocurrir como flora intestinal natural de los peces, pero en caso de condiciones de estrés, se observan síntomas desfavorables en los animales.

Núcleo de Diversidad

Se realizó una comparación mediante Diagramas de Venn de los OTUs clasificados a nivel de especie, para evaluar la cantidad de OTUs que comparten como núcleo de diversidad propia en los intestinos de cada especie animal, y que cantidad son producto de la interacción con el ambiente y las variaciones propias de cada individuo. También se realizó una comparación de las especies que comparten las dos especies y evaluar los OTUS propios de cada especie.

Según (Caballero et al., 2018) mencionan que el desarrollo de la microbiota gastrointestinal en los animales acuáticos, está influenciada por el entorno al contacto con el

agua circundante, se considera autóctona (nativa) cuando los microorganismos tienen la capacidad de colonizar la superficie epitelial del intestino del hospedero (pez), y alóctona cuando los microorganismos presentes en el medio circundante no logran permanecer dentro del intestino.

Los resultados muestran que *A. rivulatus* se pudo asociar taxonómicamente 90 OTUs y en *C. festae* 64 OTUs, y que comparten entre las dos especies 45 OTUs dentro de los cuales se encuentran los grupos más abundantes encontrados en la caracterización taxonómica como Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias. Mientras que 45 OTUs fueron exclusivos de *A. rivulatus* y 19 exclusivos de *C. festae* (Figura 20 C).

En relación a cada especie, se encontró que para *A. rivulatus* cada muestra presentó diferente número de OTUs clasificados taxonómicamente 24, 64 y 49 respectivamente. Todas las muestras compartieron 16 OTUs como núcleo de la diversidad de bacterias dentro del intestino de esta especie como Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Proteobacteria, cabe destacar que Fusobacteria pertenece exclusivamente a la especie *A. rivulatus*. Los demás OTUs corresponden a la diversidad relacionada a cada individuo. En el caso de *C. festae* se encontró 36, 23 y 46 OTUs clasificados en cada muestra respectivamente, y solamente compartieron 13 OTUs como núcleo como Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias. Hay que recalcar que muchas de los OTUs que forman los núcleos en ambas especies correspondieron a los grupos más abundantes de la caracterización taxonómica de las Bacterias.

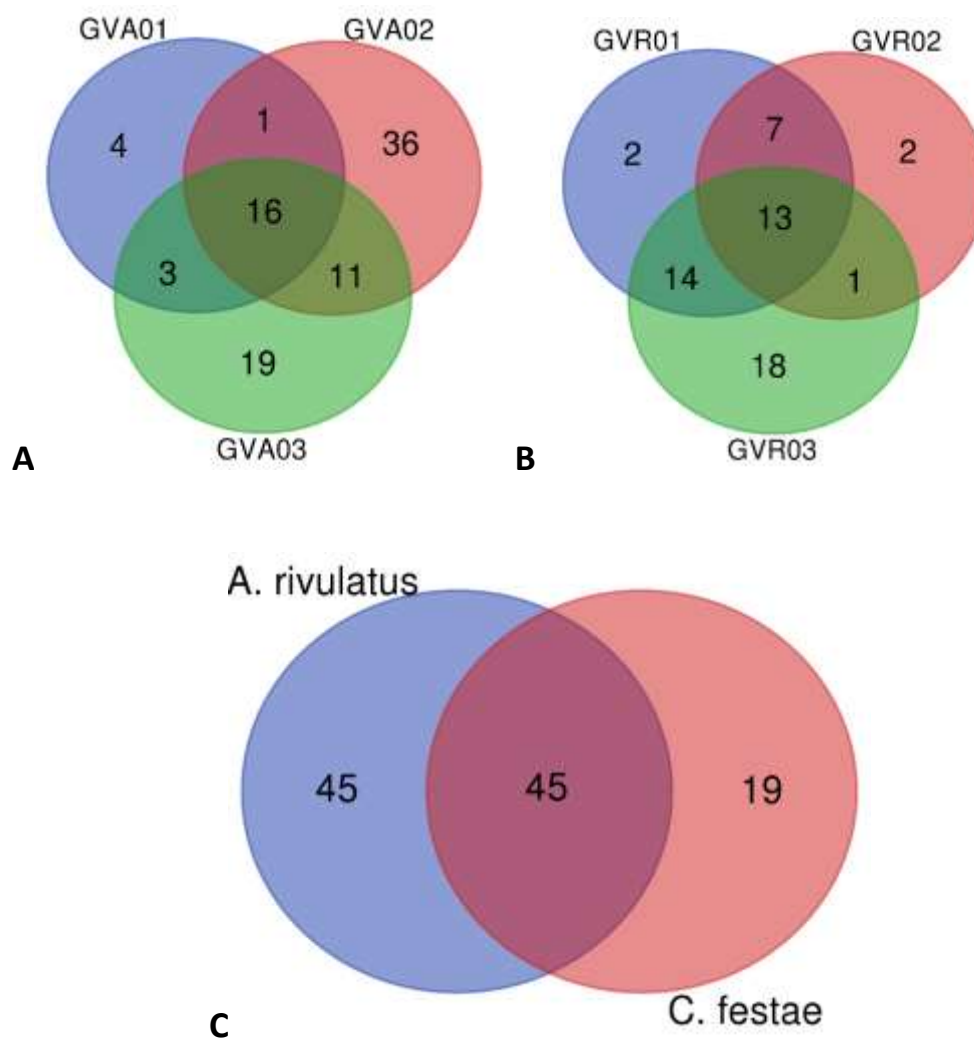
En los peces la microbiota intestinal no existe como una entidad propia, sino que es cambiante y está influenciada por el ambiente natural en el que se encuentran, es por esto que en este estudio existe una variación de la diversidad relacionada a cada individuo, ya que, esta

variación de la microbiota intestinal de los peces, se debe, principalmente, a la presencia de ambientes naturales y estas especies Vieja roja y azul estuvieron en dicho ambiente. Cabe recalcar que los autores (Caballero et al., 2018) señalan que la composición de la microbiota nativa de las mucosas y de los epitelios intestinales de los peces depende de factores genéticos, de características fisicoquímicas del ecosistema donde viven y también de factores externos como la temperatura y calidad del agua, estos últimos factores influenciaron en este estudio debido a las características que presenta el embalse “Baba” donde permanecieron estas especies.

Figura 20

Diagramas de Venn mostrando OTUs únicos y compartidos de las dos especies en estudio

A. rivulatus y *C. festae* con sus respectivas muestras



Nota. **A)** Contenido intestinal de Vieja azul, **B)** Contenido intestinal de Vieja roja y **C)** Contenido intestinal de ambas especies.

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

La microbiota de *Andinoacara rivulatus* y *Cichlasoma festae* se vio mayormente dominada por la presencia de Proteobacterias, Firmicutes y Bacteroidetes. Mientras que Fusobacteria fue abundante en *Andinoacara rivulatus*.

Las Proteobacterias se vieron representadas por la especie *Plesiomona shigelloide* y especies del género *Aeromona*, los Firmicutes por especies del género *Clostridium* y *Peptostreptococcaceae*, los Bacteroidetes por especies del Orden de los Bacteroidales, y las Fusobacterias por *Cetobacterium somaerae*.

Ambas especies compartieron un total de 45 OTUs, mientras que otros 45 OTUs fueron exclusivos de *A. rivulatus* y 19 exclusivos de *C. festae*. En cada especie se encontró un núcleo de diversidad de 16 y 13 especies respectivamente.

Mediante la identificación taxonómica molecular de las especies, las muestras de aleta dorsal de los animales recolectados de Vieja roja (VR01 Y VR02) corresponden a *Cichlasoma festae* y de las muestras (VA01 Y VA02) de Vieja azul corresponden a *Andinoacara rivulatus*, esta identificación se logró mediante el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST.

En ambas especies estudiadas, se encontró una amplia diversidad de microorganismos, con una riqueza absoluta de 87 OTUs, así como un índice de Shannon de 4.18 y 4.39 para *A. rivulatus* y *C. festae* respectivamente.

Recomendaciones

Con el fin de obtener una diversidad bacteriana más representativa se recomienda trabajar con un pul de intestinos más no, por unidad.

Realizar un estudio comparativo de la microbiota intestinal entre peces nativos en estado natural versus peces en cautiverio para así contribuir con más información sobre su adaptación, tipo de alimento y producción.

Realizar más estudios sobre la microbiota intestinal en peces de agua dulce, ya que influye de manera directa en su salud, nutrición, digestión, reproducción y crecimiento para permitir comprender el comportamiento de esta en el área acuícola.

Bibliografía

- Ajila, C. (2019). *APLICACIÓN DE ANESTÉSICO ARTESANAL DE ACEITE DE CLAVO DE OLOR (SYZYGIUM AROMATICUM) EN VIEJA AZUL (ANDINOACARA RIVULATUS)*. Retrieved from http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/13828/1/DE00001_TRABAJO DETI TULACION.pdf
- Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K. (1995). *Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation*. Retrieved from PMID: 7535888
- Anuario hidrológico. (2007). Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/23364/Cap%C3%ADtulo_3_-_Caracterizaci%C3%B3n_de_la_cuenca_del_R%C3%ADo_Guayas.pdf?sequence=7&is
- Argüello, P. (2017). *DIETA DE DIEZ ESPECIES DE PECES REPRESENTATIVOS DE LA CUENCA DEL RÍO SANTIAGO-ECUADOR (VERTIENTE DEL PACÍFICO) DEPOSITADAS EN LA COLECCIÓN DE ICTIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL*. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10960/1/T-UCE-0016-005.pdf>
- Barriga, R. (2012). LISTA DE PECES DE AGUA DULCE E INTERMAREALES DEL ECUADOR. *REVISTA POLITÉCNICA*, 83-119. Retrieved from ISSN: 1390-0129
- Bennett, K., & Eley, A. (1993). *Fusobacteria : new taxonomy and related diseases* . Retrieved from doi: 10.1099/00222615-39-4-246
- Boulenger. (1899). *Cichlasoma festae*. Retrieved from <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Boulenger. (1899). *Mesoheros festae*. Retrieved from <https://www.gbif.org/es/species/9285139>
- Butt, R., & Volkoff, H. (2019). *Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish*. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>
- Caballero, L., Campuzano, O., Monsalve, V., & Murillo, L. (2018). *Caracterización de la microbiota presente en el intestino de Piaractus brachypomus (Cachama blanca)*. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000200002#:~:text=Inicialmente%2C%20el%20intestino%20de%20los,presencia%20de%20enzimas%20digestivas%2C%20la
- Carrillo, M. (2009). *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en la acuicultura*. Retrieved from ISBN: 978-84-00-08842-2

- Chávez, J., & Litardo, O. (2019). *Ictiofauna como bioindicador de calidad del agua en el río carrizal*. Retrieved from <http://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/1209>
- Correa, F. (2018). *El impacto del microbioma en la salud de los animales*. Retrieved from <http://www.cresa.cat/blogs/sociedad/es/limpacte-del-microbioma-en-la-salut-dels-animals/>
- Donaire, K., Pérez, A., Romero, D., Cárdenas, O., & Álvarez, T. (2017). *Establishment and evaluation of two methods of pre-treatment of soil samples for the extraction of DNA for the study of bacterial diversity*. Retrieved from ISSN: 2310-0265
- Eren, M., Sogin, M., Morrison, H., Vineis, J., Fisher, J., Newton, R., & McLellan, S. (2015). *A single genus in the gut microbiome reflects host preference and specificity*. Retrieved from doi: 10.1038/ismej.2014.97
- Eschmeyer, W., Fricke, R., & Van der Laan, R. (2014). *Catalog of Fishes electronic version*. Retrieved from <http://research.calademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
- Espinosa, M., Garzón, J., & Morales, C. (2019). *Revisión: necesidades nutricionales de peces de la familia Pimelodidae en Sudamérica (Teleostei: Siluriformes)*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v67i1.33627>
- FAO. (2005). *Visión general del sector acuícola nacional-Ecuador*. Retrieved from http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_ecuador/es
- FAO. (2010). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i1820s.pdf>
- FAO. (2015). *Acuicultura con especies objeto de domesticación*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/i0283s/i0283s02.pdf>
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>
- Feria, M., Castañeda, A., Toledo, O., Castillo, D., Cueva, M., & Cedeño, V. (2019). *Caracterización molecular ómica de una cepa de Bacillus amyloliquefaciens aislada de la microbiota del paiche Arapaima gigas con actividad antagonista contra bacterias patógenas de peces*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i2.15407>
- Fjellheim, A., Playfoot, K., Skjermo, J., & Vadstein, O. (2011). *Inter-individual variation in the dominant intestinal microbiota of reared Atlantic cod (Gadus morhua L.) larvae*. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02952.x>

- Gallegos, M., Rodríguez, J., Gómez, J. C., & Angón, E. (2015). *ADAPTACIÓN Y CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA VIEJA AZUL (ANDINOACARA RIVULATUS) Y VIEJA COLORADA (CICHLASOMA FESTAE), CULTIVADAS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/287748365_ADAPTACION_Y_CURVAS_DE_CRECIMIENTO_DE_LA_VIEJA_AZUL_ANDINOACARA_RIVULATUS_Y_VIEJA_COLORADA_CICHLASOMA_FESTAE_CULTIVADAS_BAJO_CONDICIONES_CONTROLADAS
- García, D., Gutiérrez, P., & Marín, M. (2016). *Phylogenetic Analysis and Molecular Variability of Potato virus X (PVX) in Potato Crops of Antioquia*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1.51398>
- García, E. (2016). *EFFECTO DE LA DIETA EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL PARGO FLAMENCO *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869)*. Retrieved from <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/763>
- Garzón, J., & Espinosa, M. (2019). *ASPECTOS NUTRICIONALES DE PECES ORNAMENTALES DE AGUA DULCE*. Retrieved from DOI: 10.33571/rpolitec.v15n30a8
- Glodek, G. (1978). *The freshwater fishes of western Ecuador*. Northern Illinois University.
- Gonzabay, P. (2019). *CAPTURA Y ADAPTABILIDAD DE PAMPANITO *Peprilus medius* (PETER, 1869) (PERCIFORMES; STROMATEIDAE), EN JAULA FLOTANTE EN LA COMUNA DE PALMAR, ECUADOR*. Retrieved from <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5041>
- González, M. (2017). *CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS, MERÍSTICAS, DE LA CANAL Y DE LA CARNE DE ESPECIES DE PEZ NATIVAS DE AGUA DULCE DE ECUADOR*. Retrieved from <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/15214/2017000001642.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- González, M., Rodríguez, J., López, M., Vergara, G., & García, A. (2016). *Estimación del rendimiento y valor nutricional de la Vieja Azul (*Andinoacara rivulatus*)*. Retrieved from <https://talentos.ueb.edu.ec/index.php/talentos/article/view/61/94>
- Google Maps. (2020). Retrieved from <https://www.google.com/maps/search/rio+BABA+GUAYAS/@-1.6502443,-88.0997532,1526399m/data=!3m2!1e3!4b1>
- Günther. (1860). *Andinoacara rivulatus*. Retrieved from <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Hennersdorf, P., Kleinertz, S., Theisen, S., Abdul, M., Mrotzek, G., Palm, H., & Saluz, H. (2016). *Microbial Diversity and Parasitic Load in Tropical Fish of Different Environmental Conditions*. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151594>

- INATEC. (2016). *Manual del protagonista nutrición animal*. Retrieved from https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Manual_de_Nutricion_Animal.pdf
- Kessel, M., Dutilh, B., Neveling, K., Kwint, M., Veltman, J., Flik, G., . . . Camp, H. (2011). *Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (Cyprinus carpio L.* Retrieved from <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-41>
- Krajmalnik, R., Esra, Z., Wook, D., & DiBaise, J. (2012). *Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation*. Retrieved from DOI: 10.1177/0884533611436116
- Kullander, S. (2003). LOS PECES DE AGUA DULCE DE AMÉRICA CENTRAL Y DEL SUR. In R. Reis, S. Kullander , & J. Ferraris . EDIPUCRS (Editora Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).
- Kullander, S. (1998). A Phylogeny and Classification of the South American Cichlidae. In L. MALABARBA, R. REIS, Z. LUCENA , & C. LUCENA , *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (pp. 461-498). Porto Alegre, Brazil: Edipucrs.
- Laaz, E., Salazar, V., & Torres, A. (2009). Guía ilustrada para la identificación de peces continentales de la cuenca del Río Guayas. Universidad de Guayaquil.
- Lara, A. (2019). *ÍNDICE DE LA CALIDAD FÍSICA Y SENSORIAL DE LAS ESPECIES VIEJA COLORADA (Cichlasoma festae) Y VIEJA AZUL (Andinocara rivulatus) COMERCIALIZADOS EN EL MERCADO MUNICIPAL DEL CANTÓN QUEVEDO*. Retrieved from <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3814>
- Lévêque, C., Oberdorff, T., Paugy, D., Stiassny, M., & Tedesco, P. (2008). *Global diversity of fish (Pisces) in freshwater*. Retrieved from DOI 10.1007/s10750-007-9034-0
- Li, X., Zhu, Y., Ringo, E., Wang, X., Gong, J., & Yang, D. (2018). *Intestinal microbiome and its potential functions in bighead carp (Aristichthys nobilis) under different feeding strategies*. Retrieved from <https://doi.org/10.7717/peerj.6000>
- Llewellyn, M., McGinnity, P., Dionne, M., Letourneau, J., Thonier, F., Carvalho, G., . . . Derome, N. (2016). *The biogeography of the atlantic salmon (Salmo salar) gut microbiome*. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.189>
- Musilová, Z., Říčan, O., & Novák, J. (2009). *Phylogeny of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae) based on morphological and molecular data, with the description of a new genus*. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2009.00528.x>

- Nugra, F., Abad, D., & Zárate, E. (2018). *Guía de peces del alto Nangaritza*. Retrieved from ISBN: 978-9942-778-17-8
- Núñez, A. (2019). *EVALUACIÓN DE TRES NIVELES DE PROTEÍNA SOBRE EL CRECIMIENTO EN JUVENILES DE LA VIEJA COLORADA (Cichlasoma festae)*. Retrieved from <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3719/1/T-UTEQ-0028.pdf>
- Ortiz, J. (2015). *Producción dulce acuícola en el Ecuador*. Retrieved from <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10164/3/Acuacultura.pdf>
- Ortiz, J. (2019). Especies nativas del Ecuador. (D. Avilés, Interviewer)
- Pérez, L. (2020). *Microbiota intestinal. Características e interacción con la vacunación*. Retrieved from <https://nutricionanimal.info/microbiota-intestinal-caracteristicas-e-interaccion-con-la-vacunacion/>
- Pérez, R., López, R., López, S., Castellanos, J., González, C., Marín, E., . . . Cruz, R. (2020). *High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene to analyze the gut microbiome in juvenile and adult tropical gar (Atractosteus tropicus)*. Retrieved from DOI: 10.3856/vol48-issue3-fulltext-2419
- Prado, P., Aguirre, W., Moncayo, E., Amaya, R., Salazar, F., Monsalve, E., . . . Rivera, J. (2015). *Guía de peces para aguas continentales de la Vertiente Occidental del Ecuador*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/278027849_Guia_de_peces_para_aguas_continentales_en_la_vertiente_occidental_del_Ecuador
- Puello, L., Montoya, O., Castañeda, V., & Moreno, L. (2018). *Caracterización de la microbiota presente en el intestino de Piaractus brachypomus (Cachamablanca)*. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000200002
- Ramírez, C., Coronado, J., Silva, A., & Romero, J. (2018). *Cetobacterium Is a Major Component of the Microbiome of Giant Amazonian Fish (Arapaima gigas) in Ecuador*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6262583/>
- Regan. (1905). *Mesoheros ornatus*. Retrieved from <https://www.gbif.org/es/species/9530025>
- Regan. (1903). *Andinoacara sapayensis*. Retrieved from <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Regan. (1905). *Cichlasoma ornatum*. Retrieved from <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Regan. (1905). *GBIF Backbone Taxonomy. Bujurquina zamorensis*. Retrieved from <https://doi.org/10.15468/39omei>

- Revelo, W., & Laaz, E. (2012). *CATÁLOGO DE PECES DE AGUAS CONTINENTALES DE LA PROVINCIA DE LOS RÍOS - ECUADOR*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/304012205_CATALOGO_DE_PECES_DE_AGUAS_CONTINENTALES_DE_LA_PROVINCIA_DE_LOS_RIOS_-ECUADOR?enrichId=rgreq-7b4d3a14354e2e1768908756b4dfc26a-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMwNDAXMjIwNTtBUzozNzMzMzQwODMzNzcxNTIAMTQ2NjA5M
- Rodríguez, J., Moya, Á., Duarte, P., González, M., Gallegos, M., Merizalde, D., & García, A. (2014). *Aplicaciones de la colorimetría como instrumento de valoración de los recursos acuícolas nativos en Ecuador Vieja Colorada (Cichlasoma festae) y la Vieja Azul (Andinoacara rivulatus)*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/282003052_Aplicacion_de_la_colorimetria_como_instrumento_de_valoracion_de_los_recursos_acuicolas_nativos_en_ecuador_Vieja_colorada_Cichla_Somafestae_y_la_Vieja_azul_Andinoa_Cararivulatus
- Rodríguez, J. (2006). *Sobre diversidad biológica: el significado de las diversidades Alfa, Beta y Gamma*. Retrieved from http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001000015&lng=es&tlng=es.
- Rodríguez, J. (2012). *Curva de crecimiento de juveniles de vieja colorada (Cichlasoma festae)*. Retrieved from http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/12_11_12_Jorge_Magno.pdf
- Rodríguez, J., Romero, E., Prado, J., & Vásquez, E. (2019). *Genotyping-by-Sequencing of native varieties of Theobroma cacao (Malvaceae) from the States of Tabasco and Chiapas, Mexico*. Retrieved from DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.2258>
- Rodríguez, J., Vivas, R., González, M., Moya, Á., Barrera, A., González, A., & García, A. (2014). *ADAPTACIÓN DE JUVENILES DE VIEJA COLORADA CICHLASOMA FESTAE A LA CRÍA EN CONDICIONES EXPERIMENTALES CONTROLADAS*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/282003658_Adaptacion_de_juveniles_de_Vieja_colorada_Cichlasomafestae_a_la_cria_en_condiciones_experimentales_controladas
- Rossi, L., Romero, A., Zimmermann, J., Olivero, C., Zbrun, M., Frizzo, L., . . . Drago, S. (2020). *Intestinal microbiota modulation in juvenile Pacú (Piaractus mesopotamicus) by supplementation with Pyropia columbina and β -carotene*. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00508-1>
- Sala, L. (2017). *¿Qué es la Metagenómica?* Retrieved from <https://porcino.info/que-es-la-metagenomica/>

- Sasso, M. (2009). *El proyecto multipropósito Baba: disputas sobre desarrollo y sustentabilidad* . Retrieved from <http://openbiblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/53896.pdf>
- Sevilla, R. G., Diez, A., Norén, M., Mouchel, O., Jérôme, M., Verrez, V., . . . Bautista, J. (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*, 7(5), 730-734.
- Sicilia, V., Uyaguari, M., & Osorio, V. (2009). *SITUACIÓN ACTUAL DE LAS ESPECIES INTRODUCIDAS EN EL ECUADOR CON FINES ACUÍCOLAS*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/28792785>
- Soriano, E. (2018). *Estudio sobre la fisiología térmica, metabolismo respiratorio y nutrición de *Seriola lalandi**. Retrieved from <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2448>
- Tapia, A. (2012). *Caracterización de la Cuenca del río Guayas* . Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/23364/Cap%C3%ADtulo_3_-_Caracterizaci%C3%B3n_de_la_cuenca_del_R%C3%ADo_Guayas.pdf?sequence=7&is
- Teletchea, F., & Fontaine, P. (2012). *Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture*. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/faf.12006>
- Tufiño, A., Pardo, H., Contreras, D., Naranjo, A., Molina, J., Mantilla, L., & Ortiz, J. (2019). *Buenas prácticas para el cultivo de peces tropicales*.
- Valladares, L. (2016). *CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) DE MEDIO SILVESTRE: COMPARACIÓN DE MÉTODOS TRADICIONALES VERSUS MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN*. Retrieved from URI: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/151012>
- Vargas, F., & Martínez, M. (2015). *Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity*. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/raq.12102>
- Velasco, M. (2016). *Caracterización del microbioma digestivo de una línea de conejo sometida a dos tratamientos alimentarios diferentes*. Retrieved from <https://riunet.upv.es/handle/10251/74486>
- Wei, J., Guo, X., Liu, H., Chen, Y., & Wang, W. (2018). *The variation profile of intestinal microbiota in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) during feeding habit transition*. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1246-0>

Wijkmark, N., Kullander, S., & Barriga, R. (2012). *Andinoacara blombergi*, a new species from the río Esmeraldas basin in Ecuador and a review of *A. rivulatus* (Teleostei: Cichlidae). Retrieved from <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/8601>

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2004). *A greedy algorithm for aligning DNA sequences*. Retrieved from <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>