

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



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

**Inducción de la microbiota benéfica en *Totoaba macdonaldi* utilizando
probióticos del género *Bacillus* y su efecto en el estatus de salud y en
el crecimiento**

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

Presenta:

Antonio Gorriño Ames

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por:

Antonio Gorriño Ames

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Olmos Soto
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Lus Mercedes López Acuña

M.C. Manuel de Jesús Acosta Ruiz

Dr. Ernesto García Mendoza



Dra. Ana Denise Re Araujo

Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Antonio Gorriño Ames © 2022

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

Resumen de la tesis que presenta **Antonio Gorriño Ames** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en biotecnología marina

Inducción de la microbiota benéfica en *Totoaba macdonaldi* utilizando probióticos del género *Bacillus* y su efecto en el estatus de salud y en el crecimiento.

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Olmos Soto
Director de tesis

Actualmente ha surgido un interés por la utilización de harinas y aceites vegetales en dietas de peces carnívoros, tales como la harina y aceite de soya como sustitutos de la harina y aceite de pescado. Teniendo como objetivo el disminuir los costos de los alimentos y minimizar la sobreexplotación de los recursos pesqueros. No obstante, no se han obtenido resultados favorables debido a que estos contienen factores antinutricionales como inhibidores de proteasas, lectinas u oligosacáridos, que causan hipertrofias, inhibición de la absorción de nutrientes y del crecimiento, así como cambios en la respuesta inmune en los peces de cultivo. A partir de esta problemática, se ha incrementado el interés por la utilización de ingredientes funcionales como los probióticos, que favorecen la capacidad digestiva y mejoran el estatus de salud de los animales en cultivo. El objetivo del presente trabajo fue analizar los cambios en la microbiota benéfica al adicionar probióticos del género *Bacillus*, dentro de la alimentación en *Totoaba macdonaldi*, con respecto al estatus de salud y crecimiento. Para esto se seleccionaron los probióticos de *Bacillus subtilis* 9a y 9b como candidatos a probióticos, debido a su capacidad antimicrobiana, producción de enzimas digestivas y por no presentar resistencia a antibióticos y no causar hemólisis. Se realizaron 2 bioensayos de alimentación; en el primero de ellos se probó una dieta control con y sin probiótico, más dos dietas adicionadas con probiótico, con diferente porcentaje de sustitución de harina de pescado por concentrado de proteína de soya (CPS) (DC0, DC0Prob, DC30, DC60), un segundo bioensayo donde se reformularon las dietas conservando las sustituciones del CPS, disminuyendo el costo y aumentando el porcentaje de almidón. Se utilizaron 5 dietas, una de ellas la dieta comercial Skretting®, una dieta con sustitución del 30% de harina de pescado por CPS adicionada con probiótico y su control (DCML, CPS30C, CPS30Prob), así como otra dieta con sustitución del 60% por CPS adicionada con probiótico y su control (CPS60C, CPS60Prob). Se observó la calidad de tejidos, así como, un enfrentamiento contra un patógeno (*Vibrio harveyi*), ensayo de resistencia a estrés por amonio y oxigenación y una hibridación fluorescente in situ con muestras de intestino distal, para observar la inducción de la microbiota benéfica en totoaba. Se obtuvieron resultados favorables para la dieta CPS30Prob, obteniendo un mayor peso ganado con respecto a su control (CPS30C) y la dieta comercial (DCML), mejor eficiencia en crecimiento y una utilización del alimento muy similar a la dieta comercial Skretting. Se observaron las diferencias en la calidad en tejidos en peces alimentados con las diferentes dietas, en donde los peces de las dietas con sustitución del 30% fueron las que presentaron una mejor firmeza y calidad de filete con respecto a las dietas de sustitución del 60% y la dieta comercial, que obtuvo mayor contenido de grasa visceral. Se obtuvieron resultados favorables y mayor resistencia para la dieta CPS30Prob con respecto a la dieta control y comercial, durante los ensayos de resistencia a *V. harveyi*, a estrés por amonio y oxigenación. Finalmente, las muestras obtenidas al finalizar el segundo bioensayo de alimentación, tras realizar la hibridación fluorescente in situ, mostraron una inducción de bacterias benéficas por parte del probiótico *B. subtilis* 9b.

Palabras clave: *Bacillus*, *Totoaba macdonaldi*, probióticos, concentrado de proteína de soya, digestibilidad, FISH

Abstract of the thesis presented by **Antonio Gorriño Ames** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology

Beneficial microbiota induction in *Totoaba macdonaldi* using probiotics of the genus *Bacillus* and its effects on health status and growth.

Abstract approved by:

Dr. Jorge Olmos Soto
Thesis Director

Currently, interest has arisen in vegetable meals and oils in carnivorous fish diets, such as soybean meal and oil as fishmeal and fish oil substitutes, to reduce food costs and minimize the overexploitation of fishing resources. However, favorable results have not been obtained because they contain antinutritional factors such as protease inhibitors, lectins, or oligosaccharides, which cause hypertrophy, growth inhibition, nutrient absorption inhibition, and changes in the immune response of farmed fish. From this, interest has increased in the use of functional ingredients such as probiotics, which favor digestive capacity and improve the health status of farmed animals. The objective of the present work was to analyze the changes in the beneficial microbiota when adding probiotics of the *Bacillus* genus, within the diet of *Totoaba macdonaldi*, to health and growth status. For this, *Bacillus subtilis* 9a and 9b probiotics were selected as probiotic candidates due to their antimicrobial capacity, digestive enzymes production, and not present resistance to antibiotics and production of hemolysis. Two feeding bioassays were carried out; The first of them tested a control diet with and without probiotics, plus two diets added with probiotics, with different percentages of substitution of fishmeal by soy protein concentrate (SPC) (DC0, DC0Prob, DC30, DC60). A second bioassay where the diets were reformulated, keeping the SPC substitutions, reducing the cost, and increasing the percentage of starch. Five diets were used, one of them the commercial Skretting® diet, a diet with 30% substitution of fishmeal by SPC added with probiotic and its control (DCML, CPS30C, CPS30Prob), as well as another diet with 60% substitution by SPC, added with probiotic and its control (CPS60C, CPS60Prob). Tissue quality, challenge against a pathogen (*Vibrio harveyi*), ammonium and oxygenation stress resistance assay, and fluorescent in situ hybridization with distal gut samples were observed. Favorable results were obtained for the CPS30Prob diet, getting a higher weight gain to its control (CPS30C) and the commercial diet (DCML), better growth efficiency and feed utilization very similar to the Skretting commercial diet. Differences in tissue quality were observed in fish fed with the different diets, where the fish of the diets with 30% substitution were the ones that presented better firmness and fillet quality to the 60% substitution diets and the commercial diet, which obtained a higher content of visceral fat. Favorable results and best resistance were obtained for the CPS30Prob diet to the control and commercial diet, during the resistance tests of *V. harveyi*, to ammonium and oxygenation stress. Finally, after performing fluorescent in situ hybridization, the samples obtained at the end of the second feeding bioassay showed induction of beneficial bacteria by the probiotic *B. subtilis* 9b.

Keywords: *Bacillus*, *Totoaba macdonaldi*, probiotics, soy protein concentrate, digestibility, FISH

Dedicatoria

A mi querida familia y amigos, por ser lo que más adoro en este mundo, por todo lo que me han enseñado, motivado y apoyado durante el transcurso de los años. Gracias a ustedes he logrado cumplir con esta meta en mi vida.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para mi manutención durante el desarrollo de mi maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior (CICESE) y al departamento de Biotecnología Marina por haberme aceptado en su programa de estudios.

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, México, en especial, a la Unidad de Biotecnología en Piscicultura por facilitarme los organismos de *Totoaba macdonaldi*, así como la información sobre su cultivo, al Laboratorio de Nutrición Acuícola (LNA) por permitirme el procesamiento de muestras y realización de los bioensayos en sus instalaciones.

A mi director, el Dr. Jorge Olmos Soto, por aceptarme como su estudiante, por su paciencia, enseñanza, guía y amistad durante el desarrollo de mi maestría.

A los miembros de mi comité de tesis, la Dra. Lus Mercedes López Acuña, al Dr. Ernesto García Mendoza y al M.C. Manuel de Jesús Acosta Ruiz por todo su apoyo y enseñanzas durante el proceso de mi maestría.

Al Dr. Mario A. Galaviz Espinoza responsable del LNA por toda su asesoría y dedicación a lo largo de los bioensayos realizados en la FCM. A la M.C. Rosalía Contreras técnica del laboratorio de microbiología molecular y a la L. B. A. Samantha Victoria Cota técnica del LNA por su asesoría y apoyo para la realización de los análisis de las muestras, agradezco el profesionalismo y amistad de todo el personal que me ayudo a lo largo de mi tesis.

Al Dr. Fernando Barreto y M.C. Raúl Herrera por sus enseñanzas, sugerencias y por todo el apoyo brindado durante mis bioensayos.

A mi querida familia, mi padre y hermanos, muchas gracias por todo su apoyo, amor y cariño.

A mis entrañables amigos Anayr, Macareno, Brenda, Alberto, Chaket, Jorge, Cota, Franco, Cesar, Miguel, Pineda, Olvera, Luis y Jauregui. Por brindarme su valiosa amistad durante todos estos años.

A mis queridos amigos que conocí en este proceso, Fran, Matus, Gustavo, Cristina, Eduardo, Vianey, Edna, Diego, Luz y Víctor, gracias por su valiosa amistad durante este proceso, los conservaré siempre en mi corazón.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1- Antecedentes	3
1.1.1- Generalidades de <i>Totoaba macdonaldi</i>	3
1.1.2- Probióticos en la acuicultura	3
1.1.3- Producción de enzimas digestivas por <i>Bacillus</i>	5
1.1.4- Mecanismos de los probióticos del género <i>Bacillus</i> contra patógenos	7
1.1.4.1- Péptidos antimicrobianos (AMP's)	7
1.1.4.2- Quorum quenching.....	14
1.1.4.3- Producción de ácidos orgánicos	15
1.1.4.4- Competencia por sitios de adhesión y nutrientes.....	16
1.1.4.5- Estimulación del sistema inmune.....	16
1.2- Justificación	17
1.3- Hipótesis	17
1.4- Objetivos	17
1.4.1- Objetivo general.....	17
1.4.2- Objetivos específicos	18
Capítulo 2. Metodología.....	19
2.1. Selección de candidatos a probióticos	19
2.1.1. Actividad antimicrobiana contra potenciales patógenos de totoaba	20

2.1.2. Ensayo de capacidad enzimática.....	20
2.1.3. Ensayo de hemólisis.....	21
2.1.4. Ensayo de resistencia a antibióticos.....	21
2.1.5. Curvas de crecimiento bacteriano.....	22
2.3. Diseño de cultivo de totoaba.....	22
2.3.1. Peso Ganado (PG).....	24
2.3.2. Taza específica de crecimiento (TEC).....	24
2.3.3. Coeficiente térmico de crecimiento (CTC).....	25
2.3.4. Ingesta diaria de alimento (IDA).....	25
2.3.5. Supervivencia (S).....	25
2.3.6. Dieta.....	25
2.3.7. Análisis estadísticos.....	27
2.4. Calidad de tejidos.....	28
2.5. Preliminar de ensayo de enfrentamiento contra patógenos, resistencia a oxigenación y compuestos nitrogenados.....	28
2.6. Hibridación Fluorescente In Situ (FISH) y DAPI.....	29
2.6.1. Diseño de oligos.....	29
2.6.2. Preparación de controles.....	29
2.6.3. Preparación de muestras.....	30
2.6.4. Hibridación.....	30
2.6.5. Tinción DAPI.....	31
2.6.6. Microscopía.....	31
2.6.7. Método de conteo de bacterias fluorescentes de campos obtenidos en pozos de laminillas.....	31
Capítulo 3. Resultados.....	33
3.1. Selección de candidatos a probióticos.....	33
3.1.1. Actividad antimicrobiana contra patógenos.....	33
3.1.2. Ensayo de capacidad enzimática.....	37

3.1.3. Ensayo de hemólisis.....	39
3.1.4. Ensayo de resistencia de antibióticos.....	39
3.1.5. Curvas de crecimiento bacteriano.....	40
3.2. Bioensayos de alimentación con totoaba.....	41
3.2.1. 1er. Bioensayo de alimentación con totoaba	41
3.2.2. 2do. Bioensayo de alimentación con totoaba.....	42
3.3. Calidad de tejidos.....	43
3.4. Ensayo preliminar de enfrentamiento contra patógenos, resistencia a oxigenación y compuestos nitrogenados.....	45
3.5. Hibridación fluorescente In Situ (FISH) y DAPI.....	48
3.5.1. Conteo de bacterias fluorescentes de campos obtenidos en pozos de laminillas.....	50
Capítulo 4. Discusión.....	53
4.1. Selección de candidatos a probióticos.....	53
4.1.1. Actividad antimicrobiana contra posibles patógenos de totoaba.....	53
4.1.2. Ensayo de capacidad enzimática	54
4.1.3. Ensayo de hemólisis.....	55
4.1.4. Ensayo de resistencia a antibióticos	56
4.1.5. Curvas de crecimiento bacteriano	56
4.2. Bioensayos de alimentación con totoaba	56
4.2.1. Primer bioensayo de alimentación de totoaba	56
4.2.2. Segundo bioensayo de alimentación de totoaba	57
4.2.3. Calidad de tejidos.....	60
4.3. Ensayo preliminar de enfrentamiento contra patógenos, resistencia a oxigenación y compuestos nitrogenados.....	60
4.4. Hibridación fluorescente In Situ (FISH) y DAPI	62
Capítulo 5. Conclusiones	65
Literatura citada	68

Lista de figuras

Figura 1. Molécula de N- acil homoserina lactona (AHL). Extraído de Czajkowski Jafra, 2009.	14
Figura 2. Sitio de corte de las diferentes enzimas inhibidoras del quorum sensing. Extraído de Paluch et al., 2020.	15
Figura 3. Enfrentamiento de patógenos contra el probiótico <i>B. subtilis</i> 9b.	35
Figura 4. Enfrentamiento de patógenos contra el probiótico <i>B. subtilis</i> 9b en un escenario de desventaja.	35
Figura 5. Enfrentamiento del patógeno <i>V. harveyi</i> contra probióticos del género <i>Bacillus</i> , en un escenario de desventaja.	36
Figura 6. Probióticos en medios con concentrado de proteína de soya.	37
Figura 7. Probióticos en medios con leche descremada.	37
Figura 8. Crecimiento de probióticos en medio con almidón.	38
Figura 9. Crecimiento de probióticos en medios con aceite de soya.	38
Figura 10. Curvas de crecimiento de <i>Bacillus</i> 9a y 9b.	40
Figura 11. Peces alimentados con la dieta comercial con posible ictericia.	45
Figura 12. Consumo de alimento con respecto a días post-infección.	46
Figura 13. Curva de supervivencia de resistencia por falta de oxigenación.	48
Figura 14. A) Tinción DAPI de muestras iniciales de intestino distal de totoaba. B) Probióticos adheridos a fragmento de tejido de muestras de intestino en etapa final de alimentación con dieta CPS30Prob.	50
Figura 15. Conteo de bacterias fluorescentes en laminillas para los grupos bacterianos Bajas en G+C y Gammas para muestras iniciales y finales de intestino distal de totoaba.	51
Figura 16. Resultados de la técnica FISH para las siguientes muestras: A) Muestra control para sonda de Bajas G+C (<i>Bacillus subtilis</i> 9b); B) Bacterias del grupo Bajas en G+C encontradas en muestras iniciales de intestino distal de totoaba; C) Bacterias del grupo Bajas en G+C encontradas en muestras intestino distal al concluir el experimento; D) Muestra control para sonda de Gammas (<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126); E) Bacterias del grupo Gammas encontradas en muestras iniciales de intestino distal de totoaba; F) Bacterias del grupo Gammas encontradas en muestras intestino distal al concluir el experimento.	52

Lista de tablas

Tabla 1. Enzimas producidas por <i>Bacillus</i> . Extraído de Olmos-Soto, 2017.	6
Tabla 2. Péptidos antimicrobianos identificados para algunas especies de <i>Bacillus</i> . Modificado de Sumi et al., 2015.	8
Tabla 3. Péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente de la clase 1.	9
Tabla 4. Péptidos antimicrobianos de la clase 2 y sus subclases.	12
Tabla 5. Ejemplos de bacteriocinas de la clase 2 identificadas para especies de <i>Bacillus</i>	12
Tabla 6. Ejemplos de péptidos clase III identificada para especies de <i>Bacillus</i>	13
Tabla 7. Lipopéptidos del género <i>Bacillus</i> . Extraído de Sumi et al., 2015.	13
Tabla 8. Alimentos utilizados para el primer bioensayo de totoaba.	26
Tabla 9. Alimentos formulados para el segundo bioensayo de alimentación para totoaba.	27
Tabla 10. Patógenos y probióticos utilizados para el ensayo de actividad antimicrobiana.	34
Tabla 11. Actividad antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> 9b con respecto a patógenos en un escenario de ventaja.	34
Tabla 12. Actividad antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> 9b en desventaja con respecto a patógenos <i>V. harveyi</i> y <i>A. hydrophila</i>	35
Tabla 13. Actividad antimicrobiana de probióticos del género <i>Bacillus</i> en desventaja contra patógenos <i>V. harveyi</i>	36
Tabla 14. Desempeño de crecimiento en <i>Totoaba macdonaldi</i> durante el primer bioensayo con dietas experimentales con diferente sustitución de harina de pescado por concentrado de proteína de soya y adición de probióticos.	41
Tabla 15. Desempeño de crecimiento en <i>Totoaba macdonaldi</i> durante el segundo bioensayo con dietas experimentales con diferente sustitución de harina de pescado por concentrado de proteína de soya y adición de probióticos.	43
Tabla 16. Parámetros cualitativos para la calidad de tejidos internos en totoaba, alimentadas con dietas con diferente sustitución y adición de probióticos.	44
Tabla 17. Movilidad en peces con respecto a días post- infección.	46
Tabla 18. Parámetros de nitrógeno con respecto al tiempo post-infección.	47

Capítulo 1. Introducción

La acuicultura se encuentra en el sector alimenticio con más rápido crecimiento en la economía mundial. El estatus mundial de productos producidos por acuicultura ha incrementado en promedio un 5.3% anual en el periodo de 2001 a 2018 (Barange, 2018). Según el reporte de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de 2020, la producción acuícola fue de 82.1 millones de toneladas, aumentando un 3,2% con respecto a 2017. Dentro de los mayores productores de especies acuícolas para el consumo humano fueron China (47,6 millones de toneladas), India (7,1 millones de toneladas), Indonesia (5,4 millones de toneladas), Vietnam (4,3 millones de toneladas), Bangladesh (2,4 millones de toneladas), Egipto (1,6 millones de toneladas), Noruega (1,4 millones de toneladas) Chile (1,3 millones de toneladas) Myanmar y Tailandia (aproximadamente 1 millón de toneladas respectivamente). Estos países produjeron un total de 72,8 millones de toneladas que aportaron con el 88,7% del total de la producción mundial de 2018.

Por otra parte, según el anuario estadístico de acuicultura y pesca de 2018, en México se produjeron 395, 537 toneladas de productos acuícolas, de los cuales 249,181 pertenecieron a sistemas controlados (producción generada en instalaciones creadas para el cultivo de especies acuícolas mediante la aplicación de un modelo tecnológico) y 146,357 a pesquerías acuiculturales (explotación pesquera en embalses epicontinentales donde se practica la pesca comercial sustentada tanto en las siembras sistemáticas de crías de especies). Dentro de las especies con mayor producción fueron el camarón, mojarra, ostión y carpa, colocando a México en el puesto número 23 en la producción acuícola mundial (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2018).

A medida que la demanda por productos acuícolas ha incrementado a través de los años, la producción se ha intensificado produciendo más animales por unidad de espacio (Tal et al., 2009). Esto ha generado dos problemáticas importantes; por un lado, la baja digestibilidad por alimentos con sustituciones de harina de pescado, y por otro, la creciente aparición de enfermedades por patógenos como bacterias, virus y parásitos con implicaciones importantes en la economía de este sector (Carbone y Faggio, 2016; Kuebutornye, Wang, et al., 2019; Lafferty et al., 2015).

Con respecto a la primera problemática mencionada, se sabe que la mayor fuente de proteínas, aminoácidos y lípidos en los alimentos para la acuicultura, provienen de la harina y aceite de pescado (Tacon y Metian, 2015). A medida que la industria acuícola ha ido creciendo durante la década pasada, las

principales reservas marinas para la obtención de estos productos se encuentran en un estado crítico debido a la sobreexplotación. Esto ha causado un aumento significativo en los costos de los alimentos, generando grandes impactos en la rentabilidad de este sector.

A raíz de esta problemática, ha surgido el interés por utilizar harinas y aceites vegetales, que puedan sustituir estas fuentes de proteína y lípidos, y que disminuyan los costos de los alimentos. Como resultado, se han utilizado sustituciones por harina de soya, ya que representa una fuente de alto valor de proteína y aminoácidos, de bajo costo y con alto valor nutricional (Krishnan y Jez, 2018; Olmos-Soto et al., 2015). No obstante, no se han obtenido resultados favorables con la de harina de soya, ya que ésta contiene factores antinutricionales como inhibidores de proteasas, lectinas u oligosacáridos no digeribles, que causan hipertrofias, inhibición de crecimiento y absorción de nutrientes, así como alergias en peces (Olmos-Soto, 2017).

Para el caso de la problemática sobre la aparición de enfermedades, la mayoría de estas son causadas por patógenos, asociadas a géneros como *Aeromonas*, *Vibrio*, *Streptococcus*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Lactococcus*, *Pseudomonas* y *Clostridium* que han causado eventos masivos de mortandad (Burroughs et al., 2012; Kuebutornye et al., 2019; Santos et al., 2018).

Durante mucho tiempo la utilización de antibióticos ha sido una solución contra los patógenos en los animales en cultivo, pero el uso excesivo ha demostrado que puede ejercer presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas causando la aparición de patógenos resistentes a antibióticos (Baquero et al., 2008). Además, el uso excesivo de antibióticos causa la supresión del sistema inmune en los animales de cultivo y su aplicación puede extenderse al humano debido a su consumo, afectando la salud y debilitando al sistema inmune (Dawood y Koshio, 2016; Langdon et al., 2016; Van Doan et al., 2020).

A partir de estas problemáticas, se ha incrementado el interés por el uso de suplementos alimenticios que impulsen el crecimiento y el estatus de salud de los animales en cultivo, sin producir efectos secundarios adversos como los antibióticos (Foyosal et al., 2020). En este sentido, se ha propuesto como alternativa la utilización de bacterias probióticas del género *Bacillus*, las cuales han son inocuas para los animales y humanos, mejorando la capacidad digestiva de los animales, incrementando el estatus de salud y manteniendo las condiciones del agua en los estanques (Olmos-Soto, 2017; Olmos-Soto et al., 2019; Olmos-Soto y Paniagua-Michel, 2014).

1.1- Antecedentes

1.1.1- Generalidades de *Totoaba macdonaldi*

La totoaba es una especie monotípica de la familia Sciaenidae, siendo esta la de mayor tamaño dentro de este grupo (Cisneros-Mata et al., 1995). Esta se encuentra en peligro de extinción debido a su sobrepesca en décadas pasadas y pesca ilegal e incidental, generando gran preocupación por su conservación (Rodríguez y Hammann, 1981). Es una especie que se encuentra incluida en el catálogo de especies de la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres y en la clasificación en peligro de extinción bajo la NOM-059-SEMARNAT-2010 (CITES, 2019; SEMARNAT, 2010).

A principios de los años noventa se iniciaron investigaciones para establecer las bases de su cultivo con fines de repoblamiento, obteniendo como resultado el completar el ciclo reproductivo en cautiverio y desarrollar la metodología para su cultivo (True, 2012). Actualmente los avances en su cultivo han permitido catalogar a la totoaba como una especie con gran potencial acuícola, ya que se han logrado obtener organismos de 2.5 kg en un periodo de 12 meses (Juarez et al., 2016). Además, existen diversos estudios en la literatura relacionados con evaluaciones dietéticas en el estatus hematológico y bioquímico de este animal (Mata-Sotres et al., 2015; Reyes-Becerril et al., 2016; Trejo-Escamilla et al., 2017b). El uso de distintos probióticos en esta especie, para el mejoramiento del estatus de salud y crecimiento es un campo abierto para la investigación, ya que solo existen algunos estudios en alimentación en el efecto en la microbiota y solo un estudio con utilización de probióticos y prebióticos comerciales suplementados en la alimentación (Barreto-Curiel et al., 2018; González-Félix et al., 2018).

1.1.2- Probióticos en la acuicultura

Los probióticos han sido utilizados para generar resistencia a las enfermedades y son excelentes herramientas preventivas contra los patógenos (Hai, 2015). Numerosas publicaciones indican la capacidad de los probióticos en la protección de los animales en cultivo contra infecciones patógenas, tales como *Penaeus monodon* (Vaseeharan and Ramasamy, 2003), el rohu *Labeo rohita* (Kumar et al., 2006), la carpa común *Cyprinus carpio* (Yanbo and Zirong, 2006), la corvina blanca *Atractoscion nobilis* y el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (López, Olmos-Soto, Trejo Escamilla, et al., 2016; Olmos-Soto et al., 2011).

Otro de los beneficios obtenidos, son el efecto en la microbiota intestinal de los organismos en cultivo. La funcionalidad de la microbiota, depende de la capacidad de los microorganismos para interactuar dentro del tracto gastrointestinal, produciendo sustancias que pueden beneficiar al huésped al influir sobre sus funciones biológicas. La microbiota del huésped desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la salud, ya que estimula el sistema inmunológico y aumenta la resistencia contra los patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas (Van Doan et al., 2020).

Además, la microbiota intestinal se ha relacionado con los beneficios hacia el huésped a través de la alimentación, ya que se ha comprobado que puede producir diversas enzimas como carbohidrasas, celulasas, fosfatasas, esterases, lipasas y proteasas que facilitan la digestión de los alimentos (Perry et al., 2020; Ray et al., 2012; Wu et al., 2015).

En este sentido, los probióticos funcionan como moduladores entre los microorganismos benéficos y los patógenos, pudiendo modificar radicalmente la microbiota intestinal, siendo además, inocuos para los organismos en cultivo.

Dentro de los mecanismos de acción que utilizan sobre los patógenos en el tracto digestivo, se encuentran la competencia por sitios de colonización y competencia por nutrientes o fuentes de energía. Además, estos son capaces de producir sustancias inhibitoras como antibióticos, sustancias antibacteriales, sideróforos, enzimas, proteasas e inhibidores de proteasas y compuestos orgánicos como bacteriocinas. Por lo tanto, los probióticos pueden funcionar como una herramienta factible para mejorar la digestibilidad de los alimentos y reducir la presencia de patógenos oportunistas que pueden mermar la salud de las especies acuícolas, favoreciendo el rendimiento en los cultivos (Ibrahim, 2013; Santos et al., 2018).

Dentro de las especies que se utilizan comúnmente en alimentos funcionales son los del género *Bacillus*, debido al conocimiento de sus capacidades probióticas, tales como la estimulación del sistema inmune, la mejora del estatus de salud, la eliminación de bacterias patógenas, aumento en la degradación del alimento, la biorremediación y supervivencia en condiciones extremas (Olmos-Soto, 2017). Las especies del género *Bacillus* son bacterias Gram-positivas, aeróbicas o anaerobias facultativas en forma de bastón, con capacidad de formar endosporas y con una amplia gama de habilidades fisiológicas que les permiten vivir casi en cualquier ambiente natural (Turnbull et al., 1991). Además, algunas especies de este género (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. licheniformes*) son “Generalmente reconocidas como seguras” (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA, 2020; Olmos-Soto, 2017).

El uso de probióticos del género *Bacillus* en la alimentación, ha indicado que son benéficos para las especies acuícolas, demostrando los efectos de especies como *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. velenzensis*, *B. mycoides* y *B. amyloliquefaciens* en la microbiota intestinal, la digestibilidad y en la inmunidad contra patógenos. Estos estudios se han realizado en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), la carpa dorada (*Carassius auratus*), la langosta marrón (*Cherax cainii*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y otros (Foyсал et al., 2020; Gisbert et al., 2013; Kuebutornye et al., 2019; Kuebutornye, Wang, et al., 2019; Yi et al., 2018).

1.1.3- Producción de enzimas digestivas por *Bacillus*

La digestibilidad en peces está dada por la capacidad enzimática para poder digerir proteínas, lípidos y carbohidratos. En la actualidad, las dietas utilizadas para peces contienen una distribución del 24- 62% (42% en promedio) de proteína, 20% de lípidos y hasta un 10% de carbohidratos (López, Olmos-Soto, Trejo-Escamilla, et al., 2016; Olmos-Soto, 2017; Teles et al., 2020). Las proteínas constituyen el nutriente y la fuente de energía más importante para los peces debido que en su mayoría es digerida para la formación y reparación de tejido, sirven como sustrato para formación de lípidos y carbohidratos en tejido, además de utilizarse para la formación de hormonas, anticuerpos, enzimas y hemoglobina (Tacon, 1989). Los lípidos, son de suma importancia debido a que estos son componentes esenciales de todas las membranas celulares y subcelulares, son fuentes de esteroides esenciales, vehículo de vitaminas liposolubles y ayudan a la palatabilidad de los alimentos (Tacon, 1989).

Por otro lado, los carbohidratos son una fuente económica de energía al incluirla en dietas para peces, ya que funcionan como ligantes para la estabilidad de las dietas en el agua y sirven como constituyentes dietéticos que pueden aumentar la palatabilidad. Además, al ser utilizados adecuadamente, estos pueden ser sustituidos por proteína (Tacon, 1989). Sin embargo, los peces marinos carnívoros solo pueden tolerar hasta un 10% de contenido de carbohidratos, debido a su baja capacidad para digerir y asimilar los mismos, obteniendo la energía directamente de las fuentes de proteína como lo es la harina de pescado. Aun cuando los peces presenten una baja tolerancia hacia los carbohidratos, no significa que la energía obtenida de los mismos no pueda ser utilizada una vez digerida en azúcares (Olmos-Soto et al., 2019). Uno de los principales problemas existentes en la digestibilidad y asimilación de alimentos con inclusión de harinas vegetales para peces carnívoros, es que éstos tienen una deficiencia de proteasas, carbohidrasas y lipasas que limitan la digestibilidad de estas harinas vegetales en los alimentos (Olmos-Soto, 2017). La

harina de soya es un ejemplo que se utiliza como ingrediente funcional para dietas para peces carnívoros. La harina de soya representa una fuente importante de proteínas y lípidos, ya que esta puede llegar a contener hasta un 40% de proteína de alta calidad y hasta un 20% en contenido calórico de lípidos (Olmos-Soto, 2017). Sin embargo, la harina de soya contiene factores antinutricionales como inhibidores de proteasas, saponinas, lectinas, oligosacáridos asociados a daños que inhiben el crecimiento y la muerte en peces carnívoros (Fuentes-Quesada et al., 2018). Dentro de estos daños se encuentran enteritis severa del intestino distal, hipertrofia e hiperplasia pancreática y daños en el hígado (Fuentes-Quesada et al., 2018; Krogdahl et al., 2015; López et al., 2015; Olmos-Soto, 2017; Uran et al., 2008).

Por otro lado, mediante el uso de probióticos del género *Bacillus*, se ha observado una mejora en la digestibilidad y asimilación de las harinas de soya y sus factores antinutricionales en peces y camarones, ya que estos son capaces de producir diversas enzimas como proteasas, lipasas y carbohidrasas, que permiten mejorar el crecimiento y la salud de los animales en cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Enzimas producidas por *Bacillus*. Extraído de Olmos-Soto, 2017.

Enzima	Cepa productora
α -Amilasa	<i>B. amiloliquefaciens</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i>
β -Amilasa	<i>B. polymyxa</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i>
Fosfatasa alcalina	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>
Ciclodextrina glucanotransferasa	<i>B. macerans</i> , <i>B. megaterium</i>
β - Galactosidasa	<i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i>
β - Glucanasa	<i>B. subtilis</i> , <i>B. circulans</i>
β - Glucosidasa	<i>B. subtilis</i>
Glucosa isomerasa	<i>B. coagulans</i>
Glucosil transferasa	<i>B. megaterium</i>
Glutaminasa	<i>B. subtilis</i>
Galactomanasa	<i>B. subtilis</i>
β - Lactamasa	<i>B. licheniformis</i>
Lipasa	<i>B. subtilis</i>
Metaloproteasa	<i>B. lentus</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thermoproteolyticus</i>
Penicilina acilasa	<i>Bacillus sp.</i>
Pululanasa	<i>Bacillus sp.</i> , <i>B. acidopullulans</i>
Serina proteasa	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. amylosaccharicus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>
Ureasa	<i>Bacillus sp.</i>
Uricasa	<i>Bacillus sp.</i>

Es por esto que se ha generado el interés por la utilización de harinas vegetales y la adición de probióticos del género *Bacillus* como ingredientes funcionales, para poder sustituir o reducir la harina y el aceite de pescado, generando dietas de menor costo, mejorando el crecimiento y salud de los peces, y por ende mejorando la rentabilidad en la producción.

1.1.4- Mecanismos de los probióticos del género *Bacillus* contra patógenos

Los mecanismos por los cuáles, bacterias del género *Bacillus* pueden combatir enfermedades, son variados y dependen totalmente de la cepa y de su capacidad para producir sustancias que tengan acción sobre las bacterias patógenas. Dentro de estos se encuentran la producción de péptidos antimicrobianos y ácidos orgánicos, la supresión de la expresión de genes de virulencia (quorum quenching), la estimulación del sistema inmune del hospedero y la competencia por sitios de adhesión y nutrientes (Kuebutornye et al., 2019).

1.1.4.1- Péptidos antimicrobianos (AMP's)

Las especies del género *Bacillus* tienen la capacidad de producir una gran cantidad de péptidos que funcionan como antibióticos, conocidos como péptidos antimicrobianos (AMP's). Dentro de estos se encuentran moléculas como las bacteriocinas, lipopéptidos, glicopéptidos y péptidos cíclicos que tienen efectos antagonistas contra patógenos (Baindara et al., 2013; Sumi et al., 2015a). Estas moléculas son capaces de eliminar o inhibir el crecimiento de bacterias y se consideran como una alternativa contra el uso de los antibióticos (Cavera et al., 2015; Zou et al., 2018). Como los antibióticos están dirigidos a enzimas metabólicas, el uso continuo genera una presión selectiva en los patógenos y pueden generar resistencia a través de la activación de genes de resistencia a antibióticos (Preena et al., 2020). Por otro lado, los AMP's actúan mediante la generación de poros en la membrana o en la interrupción de la síntesis de la misma, siendo más difícil para los organismos patógenos el desarrollar resistencia ante estas moléculas (Sang and Blecha, 2008; Sumi et al., 2015a). En general, los AMP's son péptidos catiónicos con propiedades hidrofóbicas o anfifílicas que actúan sobre la membrana plasmática de otros microorganismos, como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, parásitos y virus (Pálffy et al., 2009; Zhao and Kuipers, 2016).

Tabla 2. Péptidos antimicrobianos identificados para algunas especies de *Bacillus*. Modificado de Sumi et al., 2015.

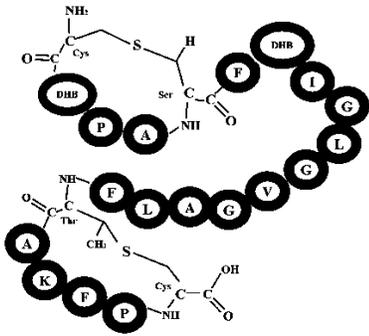
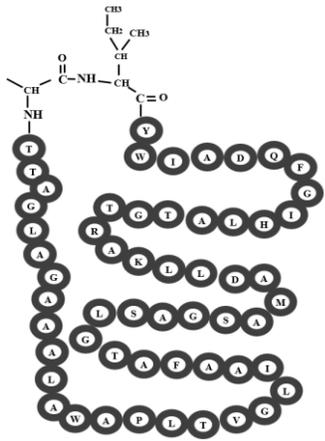
Especie de <i>Bacillus</i>	Cepa	Péptido antimicrobiano	Características	Fuente
<i>B. subtilis</i>	JM4	Subpeptina JM4-A y JM4-B	Activa contra un amplio espectro de bacterias, incluyendo <i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Suelo
	Fmbj	Surfactina y Fengicina	Antagonista para <i>B. cereus</i>	Suelo
	B-916	Bacisubina	Proteína antifúngica con actividad ribonucleasa y hemaglutinante	Suelo
	CMB32	Iturina A, Fengicina y surfactina A	Potencial para controlar la enfermedad de antracnosis causada por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Suelo
	EDR4	Proteína antifúngica E2	Actividad contra numerosas especies de hongos	Trigo
	14B	Bac14B	Desinfección de semillas	Almendra amarga
	NT6	AMPNT-6	Activa contra el patógeno <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Natto
<i>B. licheniformes</i>	H1	Sustancia parecida a Bacteriocina	Antagonista contra varias especies de bacterias Gram-positivas	Estiércol de vaca
<i>B. thuringiensis</i>	SM1	Fengicina	Actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i>	Suelo
	Kurstaki Bn-1	Thuricina Bn1	Actividad contra <i>B. cereus</i> , <i>B. weihenstephensis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> y otras cepas de <i>B. thuringiensis</i>	Plaga de avellanas
<i>B. pumilus</i>		Bacitracina	Actividad contra <i>Micrococcus luteus</i> y <i>S. aureus</i>	Suelo
<i>B. coagulans</i>	ATCC 7050	Lactosporina	Actividad contra <i>M. luteus</i> y <i>L. monocytogenes</i>	Suplemento dietético con probiótico

Los péptidos antimicrobianos se pueden dividir en 3 grupos importantes: aquellos que se sintetizan ribosomalmente (RiPPs), los no sintetizados ribosomalmente (NRP's), los policétidos (PK's) y lipopéptidos (Zhao and Kuipers, 2016).

Péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente

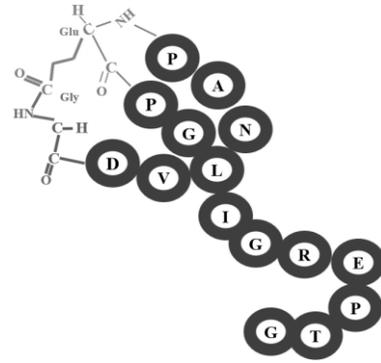
El grupo de los péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente, se divide en tres clases principales: Clase I, que consiste en aquellos que se producen ribosomalmente y tienen modificaciones postraduccionales; Clase II, que incluye a las bacteriocinas sin modificaciones; y la Clase III, que incluye proteínas antimicrobianas de gran tamaño (Zhao and Kuipers, 2016).

Tabla 3. Péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente de la clase 1.

Subclase	Características	Estructura (RiPPMiner)
Lantipéptidos	Contienen residuos de aminoácidos inusuales como dehidroalanina, dehidrobutirina, lantionina o metil lantionina.	
Péptidos cíclicos "Head-tail"	Su estructura se encuentra unidas por el extremo N y C terminal en una estructura tridimensional bien definida por plegamientos de forma hélice α . No contienen β -metil- lantionina y residuos deshidratados.	

Péptidos de
lazo

Contienen un anillo N-terminal de macrolactama enhebrado por la cola C- terminal dando como resultado una estructura característica de nudo de lazo



Clase I

En esta clase se incluyen péptidos antimicrobianos de menos de 10 kDa, que se encuentran formados por pequeños péptidos activos en membrana, resistentes a proteólisis y al calor. Son sintetizados ribosomalmente e incluyen modificaciones postraduccionales por diferentes enzimas y contienen aminoácidos como lantionina y metil-lantionina (Meade et al., 2020). Esta clase se divide en siete subclases que incluyen a los lantipéptidos, péptidos cíclicos “head-tail”, sactipéptidos, péptidos lineales que contienen azol (LAP’s), tiopéptidos, glicocinas y péptidos de lazo.

Clase II

Las bacteriocinas incluyen péptidos lineales no modificados de menos de 10 kDa que no contienen lantionina, son sintetizados ribosomalmente, termoestables, resistentes a pH y activos en membrana (Tabla 5). El agrupamiento de esta clase continúa en clasificación, pero actualmente cuenta con 4 subclases en las que se encuentran los péptidos similares a pediocina, bacteriocinas que requieren al menos 2 péptidos para su funcionamiento, bacteriocinas circulares y péptidos lineales no similares a pediocina (Meade et al., 2020).

Clase III

Los péptidos pertenecientes a la clase 3, se caracterizan por ser proteínas termolábiles, de gran tamaño (superiores a 30 kDa) con actividad antimicrobiana y con péptidos estructuralmente diferentes a las bacteriocinas (Sumi et al., 2015a; Zhao and Kuipers, 2016). Actualmente se catalogan en los subtipos: bacteriolíticas y no bacteriolíticas (Tabla 6). En la primera de ellas el carbono terminal contiene un sitio de reconocimiento para la célula objetivo, mientras que el N-terminal tiene homología con las endopeptidasas involucradas en la síntesis de la pared celular. Por otro lado, las no bacteriolíticas pueden

alterar la absorción de glucosa de otras células y también perturbar el potencial de membrana (Meade et al., 2020).

Tabla 4. Péptidos antimicrobianos de la clase 2 y sus subclases.

Subclase	Características	Modo de acción
Ila: Péptidos similares a pediocina	Péptidos lineales con una región N- terminal hidrofílica altamente conservada que contiene uniones disulfuro y una secuencia consenso YGNGVXC.	Unión al sistema de manosa fosfotransferasa (Man-PTS) y formación de poros
Ilb: Dos-péptidos	Principalmente péptidos catiónicos que requieren de 2 péptidos diferentes para formar complejos formadores de poros en membranas.	Interacción con los receptores de membrana y fuga de membrana
Ilc: Circulares	Péptidos cíclicos formados por la unión de su extremo N-terminal al C-terminal a través de un enlace amida.	Formación de poros
Ild: Péptidos lineales no similares a pediocina	Otras bacteriocinas de clase II, incluidas bacteriocinas dependientes del sistema <i>sec</i> . Moléculas catiónicas sin péptido líder N-terminal	Unión a lípido II e inhibición de la síntesis de pared celular. Unión al sistema de manosa fosfotransferasa (Man-PTS)

Tabla 5. Ejemplos de bacteriocinas de la clase 2 identificadas para especies de *Bacillus*.

Clasificación	Clase 2: Bacteriocinas	
	Subclase 2a: Bacteriocinas similares a pediocina	
Nombre	Secuencia precursora	Especies productoras predichas
Coagulina	MKKIEKLTEKEMANIIGGKYNGVTCGKHSCSVD WGKATTCIINNGAMAWATGGHQGTHKC	<i>B. coagulans</i>
	Subclase 2d: Péptidos lineales no similares a pediocina	
Cereina	MENLQMLTEEELMEIEGGWWNSWGKCVAGTIG GAGTGGLGAAAGSAVPVIGTGIGGAIGGVSGGLT GAATFC	<i>B. cereus</i>
Aureocina A53	MVAFLKLVAQLGTKAAKWAWDNKSTVINWIKNGA TFQWISDKIDSIING	<i>B. pumilus</i>

Tabla 6. Ejemplos de péptidos clase III identificada para especies de *Bacillus*.

Nombre	Especies productoras predichas
Colicina	<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i>
Pyocina AP41	<i>B. thuringiensis</i>
Peptidasa M23	<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. halodurans</i>

Tabla 7. Lipopéptidos del género *Bacillus*. Extraído de Sumi et al., 2015.

Familia de Lipopéptidos	Características	AMP	Especie
Surfactinas	Contienen un enlace éster o peptídico entre un β -OH ácido graso y el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal. Contienen 7 residuos de aminoácidos y el tercero y el sexto están en la configuración D.	Surfactina	<i>B. subtilis</i> , <i>B. polyfermenticus</i> , <i>B. megaterium</i>
		Liquenisina	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i>
		Pumilacidina	<i>B. pumilus</i>
		WH1fungina	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Iturina	Contienen un enlace éster o peptídico entre un β -NH ₂ ácido graso y el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal. Contienen 7 residuos de aminoácidos y el segundo, tercero y sexto están en la configuración D	Iturina, bacilomicinas, micosubtilina, subtuleno	<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i>
Fengicina	Contienen un enlace éster o peptídico entre un β -OH ácido graso y el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal (enlace de lactona: COOH-Ile y OH-Tyr). Contienen 10 residuos de aminoácidos y el segundo, cuarto, sexto y noveno están en la configuración D	Fengicina, Plipastatina, agrastatina 1	<i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. megaterium</i>

Péptidos no sintetizados ribosomalmente y policétidos

Dentro de este grupo se encuentran una gran variedad de péptidos con estructuras ramificadas, lineares y cíclicas que son generados a partir de enzimas conocidas como péptido sintetasa no ribosomales y policétido sintetasa (Wang et al., 2014). Los policétidos son un grupo de metabolitos secundarios, que

tienen una gran diversidad de estructuras y funciones. Estos poseen propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antiparasitarias (Zhao and Kuipers, 2016).

Lipopéptidos

Los lipopéptidos son moléculas que son sintetizadas por complejos enzimáticos de gran tamaño y son moléculas anfipáticas con una masa molecular desde los 1028 a los 1084 kDa (Tabla 7). Dentro de los más comunes son las de la familia de las iturinas, surfactinas y la fengicina que tienen actividad antifúngica (Santos et al., 2018).

1.1.4.2- Quorum quenching

Otro de los mecanismos utilizados contra los patógenos es el quorum quenching, que actúa como inhibidor del mecanismo de comunicación en bacterias, el quorum sensing. El quorum sensing es un mecanismo por el cual, moléculas de N- acil homoserina lactona son sintetizadas y secretadas hacia el medio para ser detectadas por otras bacterias alrededor. Estas señales son usadas por las bacterias para monitorear la densidad de la población y sincronizar la expresión de genes. Este mecanismo genera una variedad de respuestas como la formación de biofilm, la esporulación, "swarming", la bioluminiscencia y la virulencia (Boyen et al., 2009; Dong et al., 2002; Kuebutornye et al., 2019).

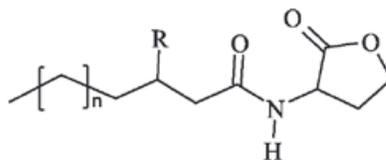


Figura 1. Molécula de N- acil homoserina lactona (AHL). Extraído de Czajkowski Jafra, 2009.

La manera en que el quorum quenching actúa sobre las señalizaciones de virulencia de los patógenos, es mediante la inhibición a través de enzimas como N-acil homoserina lactona acilasas, N- acil homoserina lactonasas y N- acil homoserina lactona oxidorreductasa (Christiaen et al., 2011; Tang et al., 2013). Las enzimas lactona acilasas actúan sobre las moléculas de N-acil homoserina lactona escindiéndolas en una homoserina lactona libre y un ácido graso, mientras que las lactonasas hidrolizan el anillo de lactona para

formar una homoserina. Por otra parte, las oxidorreductasas reducen los grupos carbonilo o hidroxilo de la cadena R-acil, inhabilitando las moléculas del quorum sensing y a su vez, inhibiendo la virulencia de los patógenos (Christiaen et al., 2011; Paluch et al., 2020).

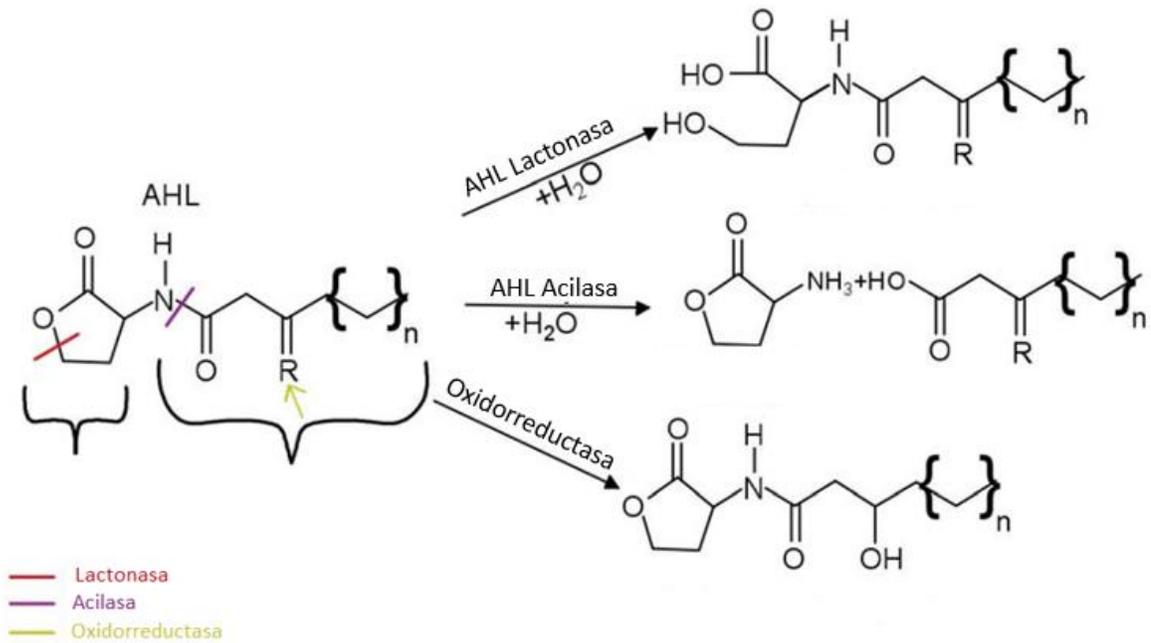


Figura 2. Sitio de corte de las diferentes enzimas inhibidoras del quorum sensing. Extraído de Paluch et al., 2020.

1.1.4.3- Producción de ácidos orgánicos

La producción de ácidos orgánicos por medio de bacterias ácido lácticas ha demostrado inhibir a microbios patógenos. Estos compuestos son producidos durante el proceso de fermentación láctica y su actividad antimicrobiana se da a través de la reducción del pH. Los niveles bajos de pH causan la acidificación del citoplasma celular y los ácidos no disociados se difunden pasivamente a través de la membrana de otras bacterias, causando un cambio en el gradiente electroquímico de protones o alterando la permeabilidad de la membrana celular, teniendo como efecto la interrupción del sistema de transporte (Kuebutornye et al., 2019; Musikasang et al., 2009). Para el caso de bacterias del género *Bacillus*, existe evidencia de que pueden llegar a producir estos compuestos. Tal es el caso del estudio de Etyemez y Balcazar de 2016, en el que se aislaron muestras bacterianas de intestino de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y se pusieron a prueba contra 2 cepas de patógenos: *Streptococcus iniae* y *Edwardsiella piscicida*. La muestra identificada como *Bacillus mojavensis* (aislado B191) dio como resultado la producción de ácidos orgánicos o compuestos dependientes del pH y a su vez demostró tener actividad antimicrobiana.

1.1.4.4- Competencia por sitios de adhesión y nutrientes

Otro de los mecanismos propuestos para la inhibición de patógenos, es la competencia por sitios de adhesión. Se ha observado que la capacidad de adherirse a la mucosa entérica y las superficies de la pared intestinal son indispensables para que las bacterias probióticas se puedan establecer en el intestino de los peces (Addo et al., 2017). Algunos estudios han demostrado la capacidad de los probióticos para adherirse al moco intestinal e inhibir patógenos, utilizando métodos in vitro, pero los efectos de exclusión competitiva aún no se encuentran bien definidos (Kuebutornye et al., 2019; Kuebutornye, Wang, et al., 2019). Algunos autores mencionan que la competencia por los sitios de adhesión y la exclusión competitiva, posiblemente se deban a la competencia por nutrientes y la formación de metabolitos como los ácidos orgánicos y el peróxido de hidrógeno, así como la producción de bacteriocinas (Addo et al., 2017; Van Doan et al., 2020).

1.1.4.5- Estimulación del sistema inmune

La estimulación del sistema inmune por medio de bacterias del género *Bacillus* es un mecanismo que se ha reportado en muchos estudios relacionados con acuicultura. Algunos estudios han demostrado evidencia sobre la estimulación del sistema inmune en peces, en donde se correlaciona la interacción de probióticos de *Bacillus* y la actividad fagocítica de los peces (Kuebutornye et al., 2019).

La actividad fagocítica a través de los neutrófilos y macrófagos juega un papel importante en la defensa contra los patógenos en peces. Estas células se encargan de eliminar bacterias a partir de la formación de especies reactivas de oxígeno, tales como aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidróxidos a través del estallido respiratorio en células fagocíticas (Akhter et al., 2015).

Se ha reportado en el bagre rallado una mayor actividad fagocítica a partir de la suplementación de una mezcla de probióticos del género *Bacillus*, al igual que en el pez loro, al suplementar la dieta con *Bacillus subtilis* E20 y disminuir la mortalidad contra *Vibrio alginolyticus* (Liu et al., 2018; Truong Thy et al., 2017). Otros reportes como el de Kumar et al., (2006), en donde el conteo de leucocitos aumentó al suplementar probióticos de *Bacillus subtilis*.

Por lo mencionado en secciones anteriores, este estudio consistió en el uso de probióticos del género *Bacillus*, suplementados en la alimentación de *T.macdonaldi*, con el fin de observar cambios en la

microbiota, mantener la microbiota benéfica, la mejora en el estatus de salud y la digestibilidad y el crecimiento de este pez marino.

1.2- Justificación

Se ha demostrado que el uso de probióticos como ingrediente funcional a la alimentación, mejora significativamente la salud, crecimiento y engorda a través de la inducción de la microbiota benéfica. Es por esto, que se promueve el uso de probióticos del género *Bacillus* para inducir la microbiota benéfica en *T. macdonaldi* y disminuir la mortalidad en el cultivo de esta especie. La inclusión de estos probióticos es importante debido al conocimiento de sus capacidades anteriormente ya estudiadas, tales como la estimulación del sistema inmune, la mejora del estatus de salud en hospedero, la eliminación de bacterias patógenas, aumento en la degradación del alimento, la biorremediación, la modulación del microbioma intestinal y supervivencia en condiciones extremas (Ibrahem, 2013; Olmos-Soto, 2017; Van Doan et al., 2020).

1.3- Hipótesis

Dietas adicionadas con probióticos del género *Bacillus* inducirán la microbiota bacteriana benéfica de totoaba (*Totoaba macdonaldi*), mejorando la salud, la digestibilidad y el crecimiento del animal.

1.4- Objetivos

1.4.1- Objetivo general

Analizar los cambios en la microbiota benéfica al adicionar probióticos del género *Bacillus* dentro de la alimentación en *Totoaba macdonaldi*, con respecto al estatus de salud y crecimiento.

1.4.2- Objetivos específicos

1. Formular una dieta de bajo costo utilizando altos porcentajes de proteína de soya, carbohidratos complejos y probióticos, que tenga un rendimiento similar o mejor que una dieta comercial.
2. Mejorar la asimilación del alimento, inducir el crecimiento y la engorda de totoaba con los probióticos adicionados.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los probióticos seleccionados contra posibles patógenos de Totoaba.
4. Correlacionar el crecimiento y el estatus de salud de totoaba con los cambios en la microbiota del tracto digestivo, al adicionar probióticos del género *Bacillus*.

Capítulo 2. Metodología

Para la presente investigación, se realizó la metodología para observar los efectos en la salud, crecimiento y la inducción de la microbiota benéfica en totoaba, por medio de la adición de probióticos del género *Bacillus* a la alimentación. En este sentido, se tomó en cuenta el seleccionar los probióticos del género *Bacillus* con actividad contra patógenos e inoos, realizar el diseño del cultivo de la fase juvenil de la totoaba, la toma de datos morfométricos, preparación de muestras e hibridación *in situ* para la observación de la microbiota presente en *T. macdonaldi*. Se administraron dos dietas y sus controles, así como, la toma de datos para observar la calidad del agua en donde se cultivaron estos organismos.

A continuación, se describen cada una de las técnicas utilizadas.

2.1. Selección de candidatos a probióticos

Para poder elegir aquellos probióticos que tengan actividad contra los patógenos y que sean inoos para la totoaba, fue necesario realizar los siguientes ensayos:

- Actividad antimicrobiana contra potenciales patógenos de totoaba
- Ensayos de capacidad enzimática
- Ensayo de hemólisis
- Ensayo de resistencia a antibióticos

Las cepas bacterianas utilizadas, se tomaron de la colección de *Bacillus* del Laboratorio de Microbiología Molecular de Biotecnología Marina en CICESE.

2.1.1. Actividad antimicrobiana contra potenciales patógenos de totoaba

Para poder observar la actividad antimicrobiana de potenciales patógenos en totoaba, se obtuvieron del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD), diferentes cepas de patógenos en peces. Para este caso se consiguieron cepas de *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas dhakensis*.

Una vez obtenidas las cepas, se activaron en medio marino modificado y se realizaron 2 ensayos. El primero de ellos, fue para simular una situación en la que el probiótico estuviera en ventaja. En este sentido se utilizaron cajas con división de medio marino modificado y justo en el centro de cada división, con ayuda de un isopo estéril, se colocó cada patógeno y al probiótico a su alrededor con una separación de medio centímetro. Estas cajas inoculadas, se colocaron en una incubadora por 24 horas a 30 °C y se tomaron medidas del tamaño y densidad de colonia, así como el tamaño de halo.

Una vez obtenidos los resultados del primer enfrentamiento se detectaron los patógenos que obtuvieron resistencia hacia *Bacillus subtilis* 9b.

Para el segundo ensayo se inocularon diferentes cepas de *Bacillus subtilis*, pertenecientes a la colección del laboratorio de microbiología molecular del departamento de Biotecnología Marina.

En este caso, contrario al primer ensayo, los probióticos fueron colocados en desventaja con respecto a los patógenos seleccionados. Con ayuda de un isopo estéril, se colocó cada probiótico y a los diferentes patógenos a su alrededor con una separación de medio centímetro y se incubaron por 24 horas a 30 °C. Nuevamente se tomaron medidas del tamaño, densidad de colonia y tamaño de halo.

2.1.2. Ensayo de capacidad enzimática.

Para realizar el ensayo de capacidad enzimática se realizó una modificación a la metodología descrita en Leonel Ochoa-Solano y Olmos-Soto (2006).

Las colonias se caracterizaron fenotípicamente y la actividad de las proteasas se probó usando placas de agar con leche descremada y concentrado de soya. Para la actividad de las enzimas Glucosidasas y α -

Galactosidasas se utilizaron medios con glucosa/almidón. Para las proteasas se utilizaron medios preparados con leche descremada y concentrado de proteína de soya.

Las placas de agar se incubaron a una temperatura de 30 °C para calcular la actividad enzimática después de 48 h. Se midió el crecimiento y el área de degradación para determinar la hidrólisis enzimática.

Para la producción de lipasas se utilizaron placas de agar con aceite de soya y solución de rodamina B al 0.001% (p/v) para observar cambio en la coloración de la colonia.

2.1.3. Ensayo de hemólisis

Para determinar si las cepas de *Bacillus* utilizadas, producían hemólisis, se utilizó la metodología descrita en Jeon et al. (2017). Se utilizaron placas de agar sangre con 5% (p/v) de sangre de oveja. Las cepas de *Bacillus* se inocularon en las placas y se incubaron a 37°C por 24 h. Se determinó el tipo de hemólisis de la siguiente manera:

α -hemólisis: Aquellas cepas que presenten un halo alrededor de la cepa de color verde (lisis parcial de eritrocitos).

β -hemólisis: Aquellas cepas que presenten un halo de hemólisis completamente claro.

γ - hemólisis: Ausencia de hemólisis.

2.1.4. Ensayo de resistencia a antibióticos

Se determinaron las concentraciones mínimas de inhibición (MIC) de acuerdo a las guías sobre la evaluación de la susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos de importancia humana y veterinaria de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Esto se realizó para las cepas de *Bacillus* con actividad contra patógenos seleccionadas a partir de los resultados de actividad antibacteriana. Estas fueron examinadas bajo el esquema general del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) para

bacterias del género *Bacillus*, en 2 réplicas independientes y se agregaron los siguientes antibióticos al agar nutritivo: ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol. Se incubaron a 30 y 37 °C por 24 h y se midió crecimiento para detectar resistencia a antibióticos.

2.1.5. Curvas de crecimiento bacteriano

Una vez seleccionadas las cepas de *Bacillus* candidatas a probióticos, se realizaron sus curvas de crecimiento bacteriano para conocer su comportamiento, actividad y los tiempos de las fases de crecimiento. En primera instancia se inocularon los probióticos de *Bacillus*, en cajas con medio LB por 12h. Posteriormente se tomó una asada de cada probiótico y se inoculó en medio Schaeffer líquido por 12 horas a 200 rpm y 37 °C. Para sincronizar los cultivos y sus réplicas, se inocularon 2 ml de cada cepa en 18 ml de medio Schaeffer y se cultivó durante 2 horas bajo las mismas condiciones hasta alcanzar el valor medio en densidad óptica de la fase estacionaria. Posteriormente se tomaron 2 ml de cultivo y se pasó a otro matraz con 18 ml de medio mineral líquido (Schaeffer) y se tomaron 100 µl en 900 µl de agua destilada cada hora para medir densidad óptica a 600 nm, hasta alcanzar la fase estacionaria.

2.3. Diseño de cultivo de totoaba

El diseño del cultivo para totoaba fue dividido en 2 bioensayos. El primero de ellos se llevó a cabo en los meses de septiembre a diciembre del año 2020. Este consistió en un cultivo de manera intensivo con un total de 108 individuos de *T. macdonaldi* con un promedio de peso de 396.4 ± 5.1 g, que fueron proporcionados por la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, México. El cultivo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Nutrición de la FCM (NutriAcua). El cultivo consistió en 3 tanques por cada tratamiento. Se probaron 1 dieta control con probiótico y sin probiótico, más 2 dietas adicionadas con probióticos, con diferente porcentaje de sustitución de harina de pescado por concentrado de proteína de soya (DC0, DC0Prob, DC30, DC60).

Para el bioensayo, los peces se cultivaron en tanques de fibra de vidrio con un volumen de 1100 l de capacidad, con agua de mar filtrada por filtración mecánica y con luz UV, con una temperatura de 25 ± 1 °C, con salinidad de 35 ± 0.5 ‰. El oxígeno disuelto cerca de 6 mg/L. Se midieron los parámetros de temperatura, oxígeno disuelto y salinidad, utilizando un oxímetro modelo YSI Pro 20I con precisión 0.02 mg/L y el pH se determinó con ayuda de un potenciómetro marca Oakton modelo pHTestr10 con una precisión de 0.01 pH. El nitrógeno amoniacal se monitoreo diariamente antes de cada alimentación, utilizando un kit Aquarium Pharmaceutical (Mars. PA. USA). Se tuvo una exposición de fotoperíodo artificial de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La medición de temperatura (°C), salinidad (ppm), oxígeno disuelto (mg/L), se determinó en 2 veces al día.

Estos cultivos experimentales se mantuvieron con un 10% de recambio de agua diario a manera de sistema semicerrado.

Un segundo bioensayo se llevó a cabo en el mismo sistema, utilizando 5 dietas, una de ellas con la dieta comercial Skretting®, una dieta con sustitución del 30% de harina de pescado por concentrado de proteína de soya adicionada con probiótico y su control (DCML, CPS30C, CPS30Prob), así como otra dieta con sustitución del 60% por concentrado de soya adicionada con probiótico y su control (CPS60C, CPS60Prob). Este ensayo tuvo una duración de 90 días, en el cual se utilizaron 12 peces por tanque por triplicado, con un promedio de peso de 153 ± 0.84 gramos. Al igual que el bioensayo anterior, los peces fueron cultivados con agua de mar filtrada por filtración mecánica y UV, con una temperatura de 24 ± 1 °C, con salinidad de 35 ± 0.5 ‰. El oxígeno disuelto de 6 mg/L. Se midieron los factores como la temperatura, oxígeno disuelto, nitrógeno amoniacal, fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, así como un recambio del 10% diario.

Para cada bioensayo se determinó la supervivencia (%), peso ganado (PG), la tasa específica de crecimiento (TEC), el coeficiente térmico de crecimiento (CTC) y la ingesta diaria de alimento (IDA)(Arriaga-Hernández et al., 2021; Hardy and Barrows, 2003).

Respectivamente los peces fueron aclimatados durante 2 semanas con la dieta específica para totoaba y posteriormente se les alimentó de manera gradual con las dietas experimentales. Se realizó una biometría cada mes y los peces fueron alimentados dos veces por día (08:00 y 16:00 horas) a saciedad aparente.

2.3.1. Peso Ganado (PG)

Para determinar el crecimiento en peso de cada tratamiento, se utilizó una balanza marca OHAUS con precisión de 0.001 g. Se realizaron 1 biometría por mes para cada estanque en cada tratamiento de acuerdo con la siguiente expresión:

$$PG = \left[\frac{PFP - PIP}{PI} \right] * 100$$

Donde:

$$PFP = \text{Peso final promedio}(g)$$

$$PIP = \text{Peso inicial promedio } (g)$$

$$PI: \text{Peso inicial del pez } (g)$$

2.3.2. Taza específica de crecimiento (TEC)

La tasa de crecimiento específico se calculó con la siguiente expresión:

$$TEC = \left[\frac{\ln PF - \ln PI}{t} \right] * 100$$

Donde:

$$Pf = \text{Peso final}$$

$$PI = \text{Peso Inicial}$$

$$t = \text{Tiempo (días)}$$

2.3.3. Coeficiente térmico de crecimiento (CTC)

El coeficiente térmico de crecimiento se calculó con la siguiente expresión:

$$TGC = \left[\frac{\sqrt[3]{PF} - \sqrt[3]{PI}}{\text{temperatura } (^{\circ}C) \times t \text{ (días)}} \right] * 1000$$

2.3.4. Ingesta diaria de alimento (IDA)

La ingesta diaria de alimento se calculó con la siguiente expresión:

$$IDA = \sum i n \left[\frac{\text{Total de alimento consumido (gr)}}{\text{no. de peces}} \right] \div t(\text{días})$$

2.3.5. Supervivencia (S)

La supervivencia como un parámetro de salud expresada en términos de porcentaje, se determinó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$S = \left[\frac{\text{No. final de peces}}{\text{No. inicial de peces}} \right] * 100$$

2.3.6. Dieta

Para el primer bioensayo de alimentación con totoabas, el laboratorio de Nutrición Acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, formuló 4 dietas isolípicas e isoproteicas. Estas consistieron en 2 dietas control con 0% de sustitución de harina de pescado con y sin probiótico y 2 dietas adicionadas con probiótico a las que se les sustituyó la harina de pescado por

concentrado de proteína de soya con un 30% y 60% de reemplazo (DC0, DC0Prob, DC30 DC60 respectivamente; Tabla 8).

Tabla 8. Alimentos utilizados para el primer bioensayo de totoaba.

Ingrediente (%)	DC0	DC0Prob	DC30	DC60
Harina de pescado	67	67	46.5	25.5
Proteína de soya	0	0	23.26	46.53
Probiótico	0	1	1	1
Almidón	5	5	5	5
Harina de trigo				
Harina de Maíz				
Gelatina				
Celulosa		Se omiten porcentajes		
Aceite de pescado				
Aceite de soya				
Otros nutrientes				
Sumatoria	100	100	100	100

Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre las dietas con 0% y 30% de sustitución con probiótico con respecto a la dieta control. Además, se pudo observar una inhibición de la actividad del probiótico en la dieta control por la cantidad de nitrógeno incluido en esta dieta, causando un efecto de menor crecimiento en los peces alimentados con la misma.

Después de analizar los resultados correspondientes al primer bioensayo y obtener los resultados en la selección de probióticos, se reformularon 2 nuevas dietas. Estas consistieron en 2 dietas con sustitución del 30% y 60% de harina de pescado por concentrado de harina soya (CPS), se probaron con la adición y ausencia de probiótico y se les aumentó el contenido de almidón (CPS30C, CPS30Prob, CPS60C y CPS60Prob). Estas dietas se compararon con una dieta comercial para totoaba de la marca Skretting® (DCML).

Tabla 9. Alimentos formulados para el segundo bioensayo de alimentación para totoaba.

Ingredientes (%)	DCML	CPS30C	CPS30Prob	CPS60C	CPS60Prob
Harina de pescado		40.5	40.5	17.2	17.2
Harina de soya		20.39	20.39	40.77	40.77
Probiótico		0	0.1	0	0.1
Almidón		16.8	16.8	16.2	16.2
Harina de trigo					
Harina de maíz					
Gelatina					
Celulosa		Se omiten porcentajes			
Aceite de pescado					
Aceite de soya					
Otros nutrientes					
Sumatoria	100	100	100	100	100
Proteína (%)	46	44.23	43.61	44.82	44.54
Lípidos (%)	12	11.05	11.95	11.34	11.80
Almidón (%)	-	14.54	12.52	13.66	13.84
Cenizas	12	9.07	9.02	5.87	5.91
ELN	-	13.84	15.84	16.72	16.50
Humedad	18	7.27	7.06	7.60	7.40

2.3.7. Análisis estadísticos

Los datos colectados fueron analizados a través de un análisis de normalidad y homocedasticidad y se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía para observar las diferencias entre las dietas con probióticos y los controles. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos. Para los datos que

presentaron normalidad se aplicó la prueba post hoc de Tukey y para aquellos datos que no presentaron normalidad, se aplicó el análisis de comparaciones múltiples por Kruskal-Wallis.

2.4. Calidad de tejidos

Al finalizar el segundo bioensayo de alimentación con totoaba y al realizar la extracción de muestras de intestino distal para la metodología de FISH, se realizó un análisis cualitativo de los órganos internos de cada totoaba. En este sentido se analizó la firmeza del músculo, la grasa visceral aparente y se realizaron observaciones generales en órganos como hígado, estómago, ciegos pilóricos, bazo e intestinos.

2.5. Preliminar de ensayo de enfrentamiento contra patógenos, resistencia a oxigenación y compuestos nitrogenados.

Una vez completados los bioensayos de alimentación con probióticos, se seleccionaron 6 peces de las dietas DCML, CPS30C y CPS30Prob y se colocaron en 3 tanques respectivamente. Los tanques fueron desconectados de la recirculación y se les disminuyó la cantidad de agua hasta 500 litros.

Cada pez fue inyectado de manera intraperitoneal con una dosis de 500 μ l de bacterias de *Vibrio harveyi* en PBS, las cuáles fueron cultivadas hasta su fase estacionaria y diluidas hasta una concentración del 10^7 UFC.

Cabe mencionar que para este ensayo no se realizó una curva de dosis letal media, debido a la poca cantidad de peces que se tuvieron para este ensayo.

Se realizó un análisis cualitativo de la salud de los peces, mediante la observación de la movilidad y la cantidad de alimento consumido. Los peces fueron alimentados una vez al día con su respectiva dieta hasta saciedad aparente.

Simultáneamente, se tomaron los parámetros de amonio, nitritos y nitratos diariamente hasta el final del experimento.

Al lograr la recuperación de los peces tras la inyección del patógeno, se realizó el ensayo de resistencia a oxigenación, el cual consistió en cerrar el flujo de oxígeno para observar las diferencias en la resistencia entre las diferentes dietas.

2.6. Hibridación Fluorescente In Situ (FISH) y DAPI

Para analizar la comunidad microbiana metabólicamente activa presente en el sistema digestivo de la totoaba, se realizó una Hibridación Fluorescente *In Situ*, la cual se llevó a cabo a partir de la extracción de muestras de tracto digestivo. La metodología a utilizar se explica en los apartados posteriores.

2.6.1. Diseño de oligos

Se obtuvieron las secuencias para el diseño de los oligos para la hibridación y se utilizaron sondas fluorescentes con fluoresceína Isotiocianato (5-FITC), Carboxi-X-Rodamina (5-(6)-ROX) específicas para bacterias y proteobacterias, Gram positivas con bajo contenido de GC.

2.6.2. Preparación de controles

Se cultivaron especies representantes de los grupos bacterianos bajas en G+C (*Bacillus subtilis* 9b) y gamma (*Vibrio harveyii*) como controles para la reacción de hibridación fluorescente *In Situ*. Estas cepas fueron cultivadas en medios complejos con condiciones para alcanzar la fase de crecimiento exponencial media a 600 nm.

Se fijaron las muestras agregando formaldehído filtrado al 37%, a una concentración final de 6% para ser incubadas durante 1 hora a 4 ° C. Se colectó 1 ml de células fijas por centrifugación a 12000 × g durante 3 minutos. Los pellets se lavaron dos veces utilizando una solución salina tamponada con fosfato, enfriada con hielo (PBS: cloruro de sodio 120 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, tampón de fosfato 10 mM [pH 7,4])

para posteriormente ser resuspendidas en 1ml de PBS. Por último, las muestras se diluyeron a 1:4 con PBS y se almacenaron a 20 °C para su uso posterior.

2.6.3. Preparación de muestras

Para la obtención de muestras para la técnica FISH se sacrificaron 5 individuos al inicio y 2 individuos juveniles por cada estanque al final del bioensayo para extraer una muestra de 1 gr de intestino distal. Estas muestras fueron suspendidas en 5 ml de formaldehído al 10% para comenzar un proceso de homogenización mecánico.

El siguiente proceso conllevó la preparación de alícuotas de 500 µl de cada tejido para centrifugarlo a 14000 rpm durante 8 minutos. Los gránulos se lavaron dos veces en PBS filtrado en hielo (Tamaño de poro del filtro de 0,2 µm) y se suspendieron en 1 ml de PBS.

Se realizaron diluciones en serie para distribuir alícuotas de 15 µl en portaobjetos de teflón de 12 pocillos (Frischer et al., 1996; Hernández-Zárte y Olmos-Soto, 2004). Se incluyeron controles positivos usando cepas tipo, como control de inóculo (muestra ambiental inoculada con una cepa tipo) en cada portaobjetos. Los portaobjetos se dejaron secar a 37 °C y se trataron con solución de etanol / formaldehído (90:10) durante 5 minutos, para posteriormente enjuagarlas dos veces en agua destilada y secar a 37 °C.

2.6.4. Hibridación

La hibridación in situ de controles y muestras de tejido se realizó como se describió anteriormente en Frischer et al. (1996) y Hernández y Olmos (2004). Se añadieron 40 µl de mezcla de hibridación con 1 ng/µl de sondas a las muestras inmovilizadas en portaobjetos, evitando la formación de burbujas. La mezcla de hibridación contiene 10 × tampón SET (1 × SET: NaCl 150 mM, Tris - HCl 20 mM [pH 7,8], EDTA 1 mM), albúmina de suero bovino al 0,2% (p / v), ácido poliadenílico al 0,01% y 11% de sulfato de dextrano (9 p/v).

Los portaobjetos se colocaron en una cámara humidificada con trozos de papel saturado (1 × SET) y se incubaron durante toda una noche a 37 °C en oscuridad. Después de la hibridación, los portaobjetos se

lavaron 2 veces con 1 × tampón SET durante 1 minuto cada vez. Los portaobjetos se secaron en oscuridad y se añadió en cada pocillo, 5 µl de fluido de montaje (10x tampón SET, 50% de glicerol, 0.1% de p-fenilendiamono dihidroclorido). Finalmente, se aplicó un cubreobjetos para analizar las muestras.

2.6.5. Tinción DAPI

Las muestras control y las muestras de tejido inmovilizadas en portaobjetos se tiñeron durante 5 minutos en la oscuridad usando 15 µl de solución de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 7,75 µg / ml en agua destilada filtrada a través de filtro de 0,2 µm).

2.6.6. Microscopía

La fluorescencia de las muestras se analizó utilizando un accesorio para el microscopio con filtros WU (395–440 nm: DAPI), MF (400–700 nm: 5 objetivos FITC o 5 (6) -ROX) y Plan Fluorita Universal. Las imágenes digitales se procesaron con un paquete de software para el análisis de imágenes.

2.6.7. Método de conteo de bacterias fluorescentes de campos obtenidos en pozos de laminillas

Este método consistió en tomar fotografías con el microscopio y procesar y contabilizar las imágenes con el paquete Fiji de Image J Java 1.80_172. Se obtuvieron 10 campos elegidos al azar para cada muestra y para cada sonda. Se contaron las bacterias que hibridaron con las sondas específicas de cada grupo.

El conteo de bacterias por mililitro se realizó utilizando la metodología de Garcia y Olmos 2007. La determinación se llevó a cabo a partir de los valores del área del pozo, el área de la fotografía tomada, el volumen y la dilución de la muestra aplicada utilizando las siguientes formulas:

$$\text{Bacterias/ml} = \frac{(\text{Conteo de bacterias} * \text{campos por pozo})(1000 \mu\text{l PBS})}{15 \mu\text{l de dilución aplicada a portaobjetos}}$$

$$\text{Campos por pozo} = \frac{\text{Área de pozo}}{\text{Área de fotografía}}$$

Donde:

- Conteo de bacterias= Bacterias contadas con el software Fiji de ImageJ Java 1.80_172
- Área de pozo= 19,635,000 μm^2
- Área de fotografía= 203,970 μm^2

Capítulo 3. Resultados

A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras realizar las metodologías presentadas en el capítulo anterior.

3.1. Selección de candidatos a probióticos

Para poder elegir los candidatos a probióticos se realizaron los análisis de actividad antimicrobiana, capacidad antimicrobiana, hemólisis y resistencia a antibióticos. A continuación, se muestran los resultados para cada uno de ellos.

3.1.1. Actividad antimicrobiana contra patógenos.

Durante el primer ensayo de actividad antimicrobiana, se seleccionó como probiótico candidato a *Bacillus subtilis* 9b, ya que este fue utilizado anteriormente en alimentos para otros organismos, obteniendo buenos resultados.

Esta cepa se inoculó de manera que tuviera ventaja hacia los patógenos (Tabla 10), para así poder ver cuáles fueron más resistentes hacia el probiótico.

Los patógenos que mostraron resistencia hacia al probiótico en ventaja fueron los patógenos *Vibrio harveyi* CAIM 699 (3) y *Aeromonas hydrophila* CAIM 675 (2) (Tabla 11, Figura 3).

Posteriormente, se inoculó al probiótico en un escenario de desventaja en donde este se colocó en el centro de la división de la caja y a su alrededor se colocaron los patógenos que mostraron resistencia en el ensayo anterior (2, 3). Los resultados para este ensayo fueron que el probiótico *Bacillus subtilis* 9b logró crecer efectivamente teniendo actividad contra la cepa de *Aeromonas hydrophila* (2), sin embargo, no obtuvo una inhibición significativa hacia la cepa de *Vibrio harveyi* (3) (Tabla 12, Figura 4).

Tabla 10. Patógenos y probióticos utilizados para el ensayo de actividad antimicrobiana.

Patógenos No. Catalogo CAIM	Nomenclatura	Cepa
CAIM 163	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
CAIM 675	2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
CAIM 699	3	<i>Vibrio harveyi</i>
CAIM 1249	4	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Probióticos		
	9b	<i>Bacillus subtilis</i> 9b
	34	<i>Bacillus subtilis</i> 34
	9a	<i>Bacillus subtilis</i> 9a
	18-5	<i>Bacillus subtilis</i> 18-5
	21b	<i>Bacillus subtilis</i> 21b
	33	<i>Bacillus subtilis</i> 33
	JOS	<i>Bacillus subtilis</i> JOS

Tabla 11. Actividad antimicrobiana de *B. subtilis* 9b con respecto a patógenos en un escenario de ventaja.

Nomenclatura	Tamaño de colonia	Densidad	Tamaño de halo
1-9b-r1	+++	°°°	-
1-9b-r2	+++	°°°	-
2-9b-r1	+++	°°°	+
2-9b-r2	+++	°°°	+
3-9b-r1	++++	°°	-
3-9b-r2	++++	°°	-
4-9b-r1	+++	°°	-
4-9b-r2	+++	°°	-

Tamaño de colonia y halo (++++ 15-20; +++ 10 - 15; ++ 5- 10; + 1-5, - 0 mm).

Densidad (°°° Alta, °° media, ° baja, nula)

1-9b-r1= 1: ID de nomenclatura del patógeno en ventaja (tabla 10); 9b: probiótico utilizado; r1: número de réplica

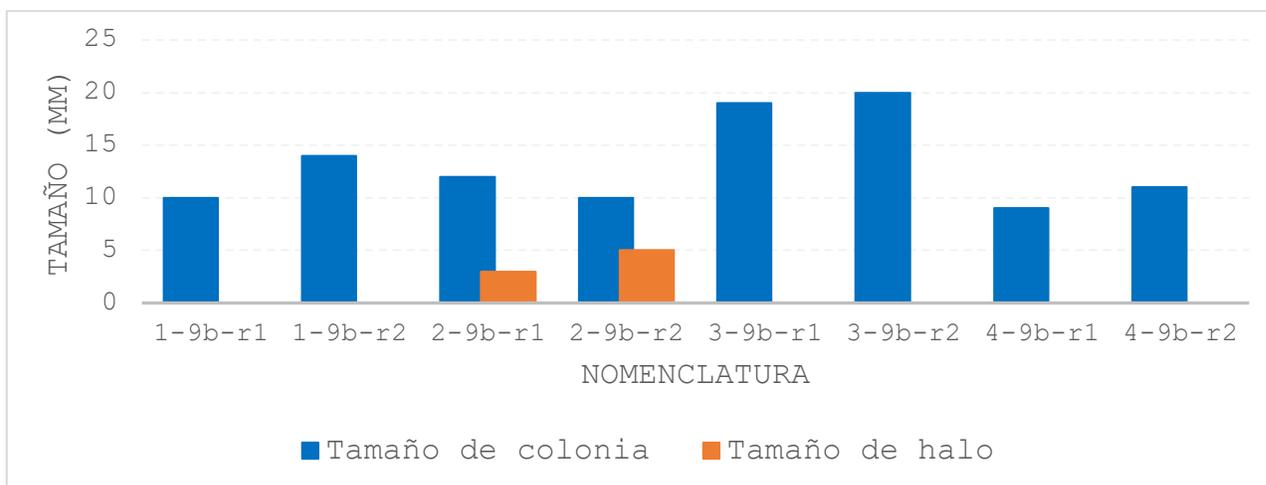


Figura 3. Enfrentamiento de patógenos contra el probiótico *B. subtilis* 9b.

Tabla 12. Actividad antimicrobiana de *B. subtilis* 9b en desventaja con respecto a patógenos *V. harveyi* y *A. hydrophila*.

Nomenclatura	Tamaño de colonia	Densidad	Tamaño de halo
9b-2- r1	+++	°°°	+
9b-2- r2	+++	°°°	+
9b-3-r1	++	°°°	-
9b-3-r2	++	°°°	-

Tamaño de colonia y halo (++++ 15-20; +++ 10 - 15; ++ 5- 10; + 1-5, - 0 mm).

Densidad (°°° Alta, °° media, ° baja, nula)

9b-2-r1= 9b: ID de nomenclatura del probiótico en desventaja (tabla 10); 2: ID nomenclatura de patógeno utilizado; r1: número de réplica

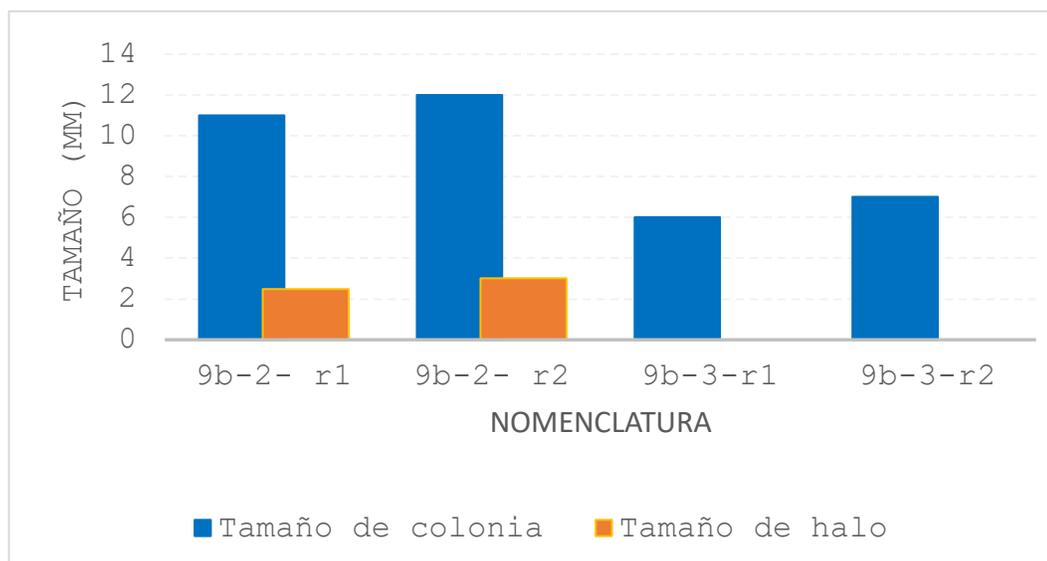


Figura 4. Enfrentamiento de patógenos contra el probiótico *B. subtilis* 9b en un escenario de desventaja.

Tras obtener estos resultados, se escogieron 6 cepas de *Bacillus*, provenientes de la colección del laboratorio de microbiología molecular del departamento de Biotecnología Marina (Tabla 10). Estas cepas fueron inoculadas nuevamente en medio marino modificado, en desventaja contra el patógeno de *V. harveyi* (3) por 24 horas a 30 °C.

Dentro de las cepas que tuvieron un mejor desempeño en la inhibición del patógeno, fueron los probióticos 9a y 34 (Tabla 13, Figura 5).

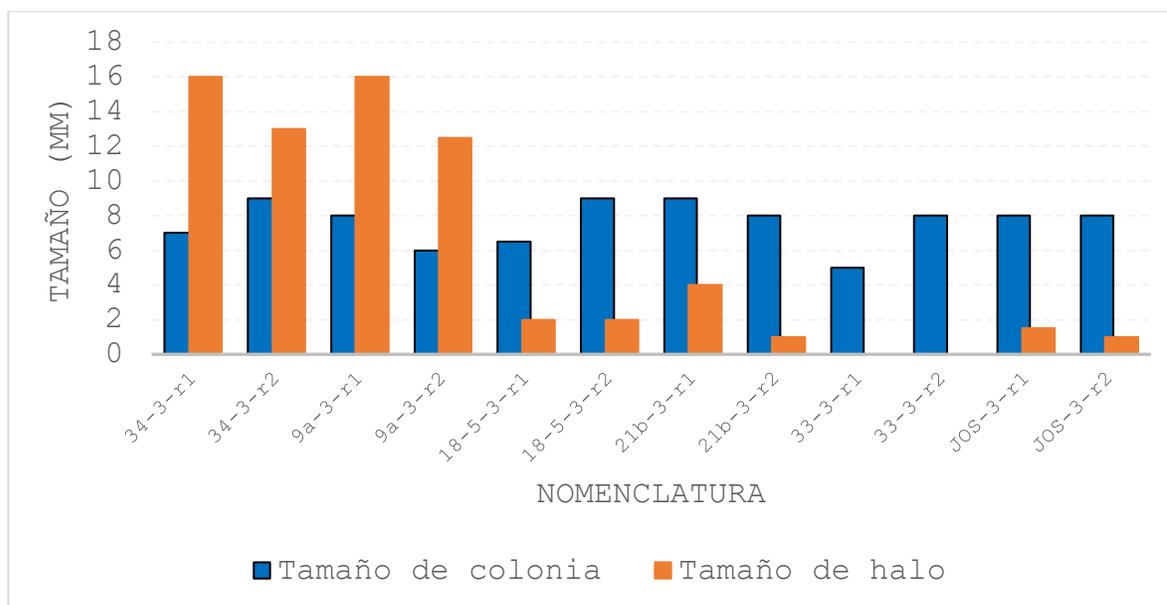


Figura 5. Enfrentamiento del patógeno *V. harveyi* contra probióticos del género *Bacillus*, en un escenario de desventaja.

Tabla 13. Actividad antimicrobiana de probióticos del género *Bacillus* en desventaja contra patógenos *V. harveyi*.

Nomenclatura	Tamaño de colonia	Densidad	Tamaño de halo
34-3-r1	++	°	++++
34-3-r2	++	°°	++++
9a-3-r1	++	°	++++
9a-3-r2	++	°	++++
18-5-3-r1	++	°°°	+
18-5-3-r2	++	°°°	+
21b-3-r1	++	°	+
21b-3-r2	++	°	+
33-3-r1	++	°	-
33-3-r2	++	°	-
JOS-3-r1	++	°	+
JOS-3-r2	++	°	+

Tamaño de colonia y halo (++++ 15-20; +++ 10-15; ++ 5- 10; + 1-5,- 0 mm).

Densidad (°°° Alta, °° media, ° baja, nula)

34-3-r1= 34: ID de nomenclatura de probiótico (Tabla10); 3: ID de nomenclatura de patógeno; r1: número de réplica

3.1.2. Ensayo de capacidad enzimática

Las cepas de *Bacillus* fueron sometidas a un ensayo de capacidad enzimática en donde los probióticos asignados como 9a y 9b se inocularon en cajas con medios enriquecidos con concentrado de proteína de soya, leche descremada, almidón y aceite de soya para observar la capacidad de producción de proteasas, carbohidrasas y lipasas respectivamente. Las cepas fueron inoculadas en estos medios e incubadas por un periodo de 48 horas a una temperatura de 30 °C.

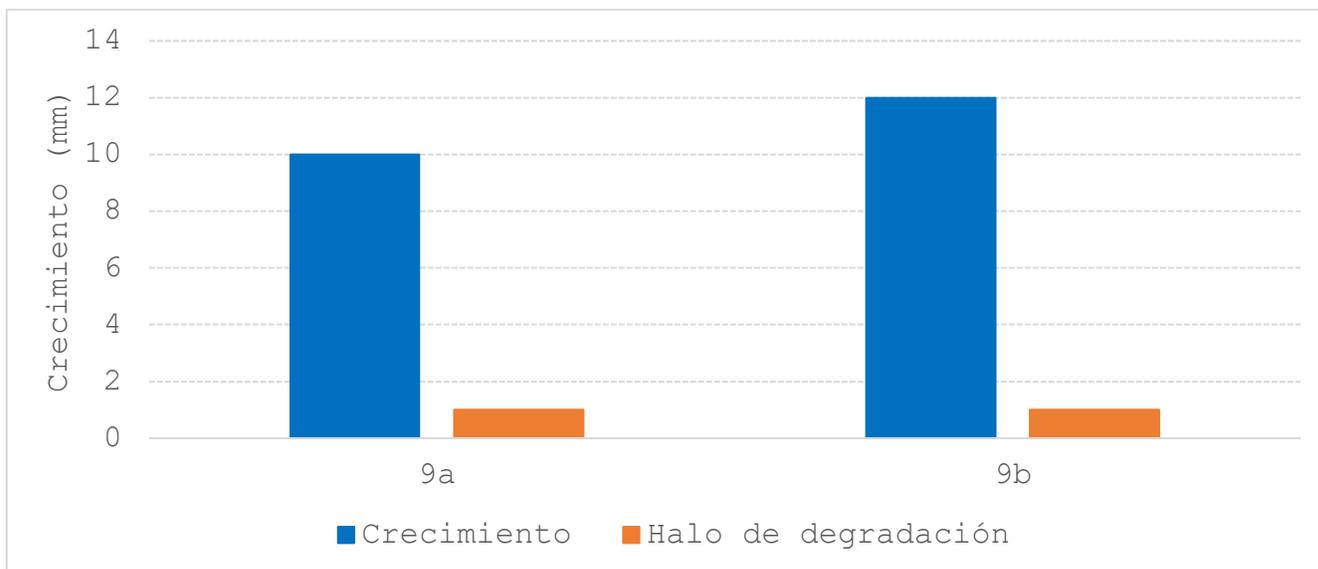


Figura 6. Probióticos en medios con concentrado de proteína de soya.

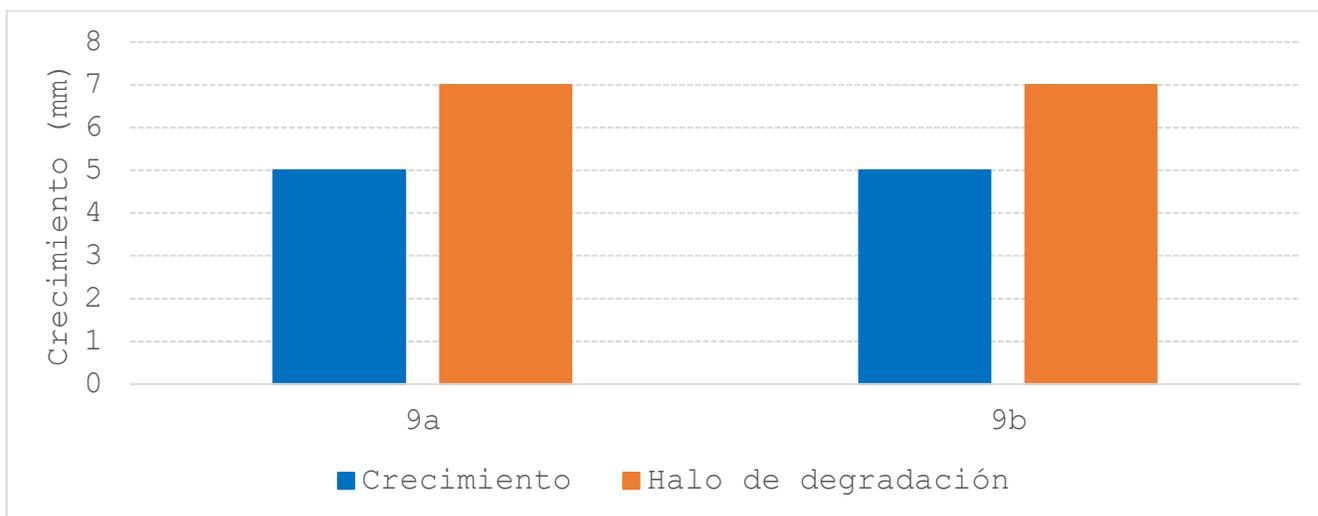


Figura 7. Probióticos en medios con leche descremada.

Para la producción de proteasas, se mostró un mejor crecimiento de colonia en ambos probióticos en medios enriquecidos con concentrado de proteína de soya con respecto a los enriquecidos con leche descremada. En ambos medios, los probióticos 9a y 9b crecieron y formaron un halo de degradación similar (Figura 6 y 7). Sin embargo, para los medios enriquecidos con leche descremada, se pudo observar un tamaño de halo de degradación mayor que el de las colonias.

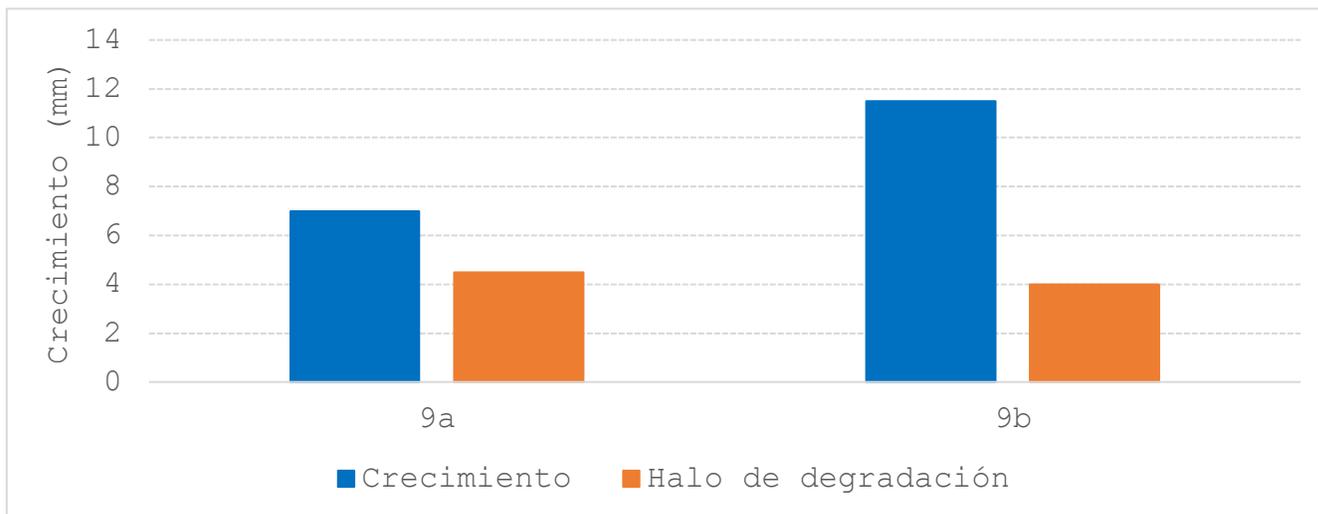


Figura 8. Crecimiento de probióticos en medio con almidón.

En el ensayo para la producción de carbohidrasas, se mostró un mejor crecimiento en el medio enriquecido con almidón para la cepa 9b con respecto a la cepa 9a (Figura 8). Este fue un resultado importante, ya que se pudo realizar la reformulación de la dieta del segundo bioensayo aumentando el contenido en el porcentaje de almidón.

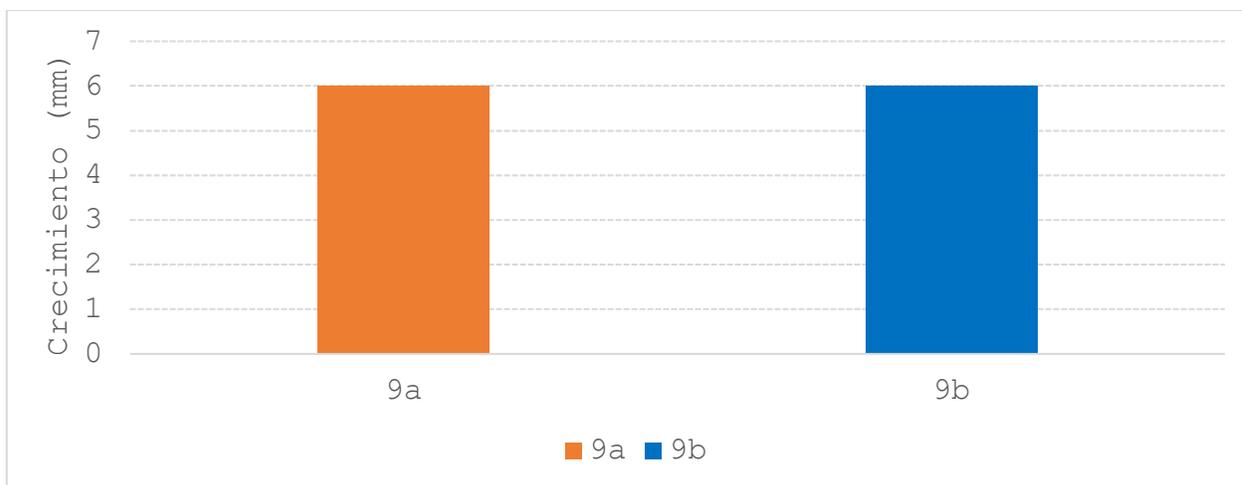


Figura 9. Crecimiento de probióticos en medios con aceite de soya.

Finalmente, para la producción de lipasas en medios enriquecidos con aceite de soya (Figura 9), ambas cepas crecieron igual y mostraron un cambio de coloración a rosa en la colonia y un halo de coloración naranja, indicando la capacidad de producción de lipasas y la degradación del aceite de soya.

3.1.3. Ensayo de hemólisis

Para determinar si las cepas de *Bacillus* utilizadas, producían hemólisis, se utilizó la metodología descrita en (Jeon et al., 2017). Se utilizaron placas de agar sangre con 5% (p/v) de sangre de oveja. Las cepas de *Bacillus* 9a y 9b se inocularon en las placas y se incubaron a 37°C por 24 h. Se determinó el tipo de hemólisis de la siguiente manera:

α -hemólisis: Aquellas cepas que presenten un halo alrededor de la cepa de color verde (lisis parcial de eritrocitos).

β -hemólisis: Aquellas cepas que presenten un halo de hemólisis completamente claro.

γ - hemólisis: Ausencia de hemólisis.

En este sentido, ambas cepas presentaron ausencia de hemólisis (γ - hemólisis), por lo que se determinó que son seguras para poder utilizarse como candidatos a probióticos.

3.1.4. Ensayo de resistencia de antibióticos

Se determinaron las concentraciones mínimas de inhibición (MIC) de acuerdo a las guías sobre la evaluación de la susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos de importancia humana y veterinaria de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Esto se realizó para las cepas de *Bacillus* 9a y 9b. Estas fueron examinadas en 2 réplicas independientes y se agregaron los siguientes antibióticos al agar nutritivo: ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina

y cloranfenicol. Se incubaron a 30 y 37 °C por 24 h y se midió crecimiento para detectar resistencia a antibióticos.

Ambas cepas no presentaron crecimiento en ninguno de los antibióticos utilizados a las diferentes temperaturas, por lo que se determinó que no presentaron resistencia a los antibióticos y que son seguras para poder utilizarse como candidatos a probiótico.

3.1.5. Curvas de crecimiento bacteriano

Se realizaron las curvas de crecimiento bacteriano para conocer su comportamiento, actividad y los tiempos de las fases de crecimiento. En primera instancia se inocularon los probióticos de *Bacillus* 9a y 9b, en cajas con medio LB por 12h. Posteriormente se tomó una asada de cada probiótico y se inoculó en medio Schaeffer líquido por 12 horas a 200 rpm y 37 °C. Para sincronizar los cultivos y sus réplicas, se inocularon 2 ml de cada cepa en 18 ml de medio Schaeffer y se cultivó durante 2 horas bajo las mismas condiciones hasta alcanzar el valor medio en densidad óptica de la fase estacionaria. Posteriormente se tomaron 2 ml de cultivo y se pasó a otro matraz con 18 ml de medio mineral líquido (Schaeffer) y se tomaron 100 µl en 900 µl de agua destilada cada hora para medir densidad óptica a 600 nm, hasta alcanzar la fase estacionaria. Ambas cepas (9a y 9b), alcanzaron su fase estacionaria a las 8 horas (Figura 10).

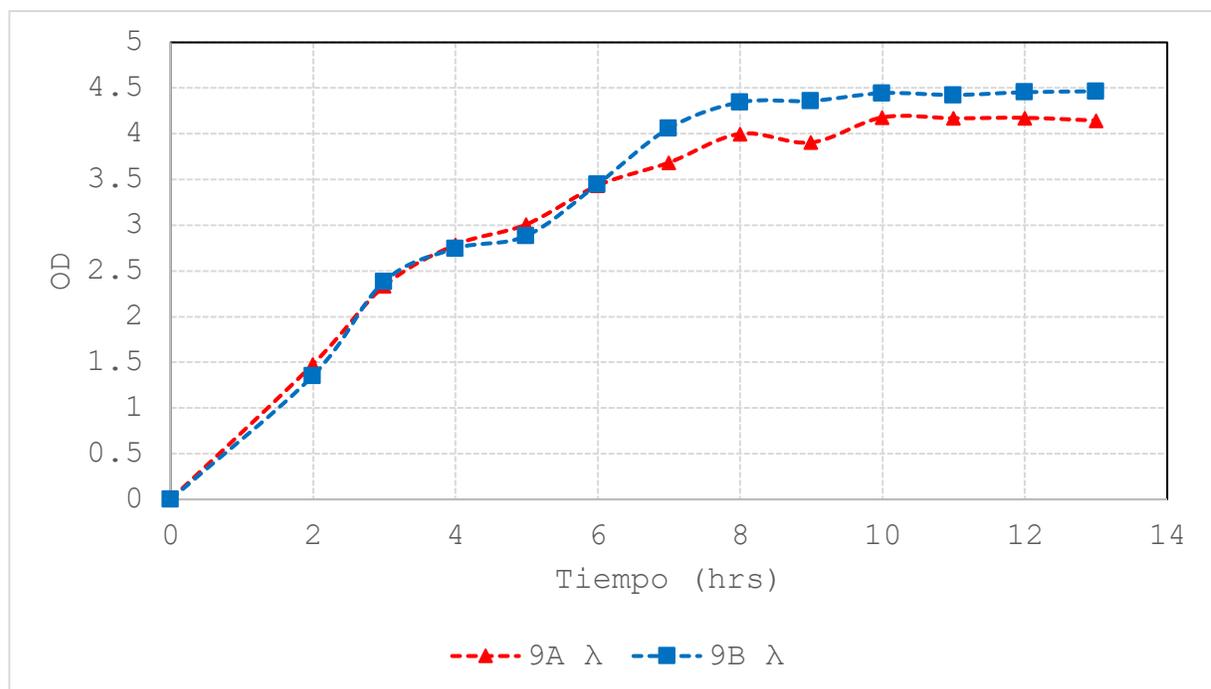


Figura 10. Curvas de crecimiento de *Bacillus* 9a y 9b.

3.2. Bioensayos de alimentación con totoaba

3.2.1. 1er. Bioensayo de alimentación con totoaba

Al finalizar el primer bioensayo de alimentación de totoaba, el porcentaje de supervivencia fue mayor al 94.4% para las dietas DC0, DC0Prob y DC30, mientras que la dieta de mayor sustitución (DC60) fue la que se vio afectada por la inclusión de CPS.

Para el caso del peso ganado (PG), se observaron diferencias significativas entre las dietas control (DC0), control con probiótico (DC0Prob) y sustitución del 60% de harina de pescado (D60) ($P < 0.001$). Por otro lado, la dieta con sustitución de 30%, se comportó similar a las dietas controles con y sin probiótico, pero también se observaron diferencias significativas con respecto a la dieta de sustitución del 60% ($P < 0.001$). Los parámetros de tasa de crecimiento específico (SGR), el coeficiente térmico de crecimiento y el alimento consumido diario (DFI), se mantuvieron muy similares en las dietas sin sustitución y con sustitución de 30%, mientras que la dieta con sustitución del 60% disminuyeron significativamente ($P = 0.001$). La dieta control con probiótico mostró un crecimiento menor que la dieta sin probiótico ($P = 0.012$). La dieta con sustitución del 30% creció 2.02% menos que la dieta control sin sustitución, ya que se esperaba ver una mayor diferencia en crecimiento y la digestibilidad (Tabla 14).

Tabla 14. Desempeño de crecimiento en *Totoaba macdonaldi* durante el primer bioensayo con dietas experimentales con diferente sustitución de harina de pescado por concentrado de proteína de soya y adición de probióticos.

	Dietas			
	DC0 ^A	DC0Prob ^B	DC30 ^C	DC60 ^D
PI	389.6 ± 5.20 g	396.7 ± 6.50 g	402.1 ± 7.32 g	397.1 ± 6.20 g
PF	1501 ± 37.27 g ^D	1461 ± 23.16 g ^D	1525 ± 41.35 g ^D	996.1 ± 58.09 g ^{ABC}
PG	286.6 ± 3.70 g ^{BD}	270.2 ± 4.5 g ^{AD}	280.8 ± 5 g ^D	151.8 ± 2.30 g ^{ABC}
TEC	1.46 ± 0.01 g ^D	1.42 ± 0.005 g ^D	1.45 ± 0.02 g ^D	0.96 ± 0.07 g ^{ABC}
CTC	1.75 ± 0.02 g ^D	1.694 ± 0.01 g ^D	1.753 ± 0.03 g ^D	1.087 ± 0.09 g ^{ABC}
IDA	10.90 g	10.89 g	10.87 g	6.37 g
S	100 %	100 %	94.44 %	88.89 %
Aumento PI	3.85	3.68	3.79	2.51

Superíndices indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

PI: peso inicial; PF: peso final; PG: peso ganado; TEC: tasa específica de crecimiento; CTC: coeficiente térmico de crecimiento; IDA: ingesta diaria de alimento; S: supervivencia

A partir de los resultados del primer bioensayo, se propuso realizar un segundo bioensayo, para ello, se reformularon nuevamente las dietas con sustitución de 30 y 60%, aumentando la cantidad de almidón, para asegurar el crecimiento y la adhesión del probiótico y lograr beneficiar el crecimiento y digestibilidad de totoaba, ya que con los ensayos de capacidad enzimática se corroboró que el probiótico utilizado (*B. subtilis 9b*) crecía favorablemente en presencia de almidón.

3.2.2. 2do. Bioensayo de alimentación con totoaba

Para el final del segundo bioensayo de alimentación con totoaba, se pudo observar una supervivencia del 100% para la dieta comercial (DCML) y las dietas con sustitución del 30% con y sin probiótico, en donde no se mostró ningún efecto por la sustitución de harina de pescado en estos tratamientos. Sin embargo, para las dietas de sustitución del 60%, se logró observar un efecto por la sustitución por concentrado de proteína de soya y el efecto benéfico del probiótico, en donde los peces alimentados con la dieta control (CPS60C) obtuvieron un 61.11% de supervivencia, mientras que la dieta con el probiótico (CPS60Prob) obtuvo una supervivencia del 83.33%. Para los parámetros de peso ganado (PG) la dieta que obtuvo los valores más altos fue la dieta con sustitución del 30% con probiótico (325.5 ± 3.86 g), presentando diferencias significativas con respecto a la dieta comercial ($P=0.003$) y las dietas con sustituciones del 60% ($P<0.001$). La dieta control con sustitución del 30% solo presentó diferencias significativas en la ganancia de peso con las dietas de mayor sustitución.

Sin embargo, aunque las dietas de mayor sustitución (CPS60C y CPS60Prob) presentaron menor crecimiento que la dieta comercial y sustituciones de 30%, se observó un mejor crecimiento y supervivencia en la dieta adicionada con el probiótico con respecto a su control ($P<0.001$).

Para los parámetros de la tasa de crecimiento específico y el coeficiente térmico de crecimiento, la dieta comercial y las dietas de sustitución del 30% se mantuvieron similares, mientras que las dietas con sustitución del 60% presentaron diferencias significativas, siendo la dieta CPS60C, la que obtuvo los valores más bajos ($P<0.0001$).

Aunado a lo anterior, se observó un mejor desempeño en las dietas utilizadas en el presente bioensayo con respecto al primero, ya que los peces alimentados con las dietas crecieron hasta 4 veces su peso inicial,

mientras que en las dietas alimentadas durante el primer bioensayo aumentaron 3.8 veces su peso inicial (Tabla 15).

Tabla 15. Desempeño de crecimiento en *Totoaba macdonaldi* durante el segundo bioensayo con dietas experimentales con diferente sustitución de harina de pescado por concentrado de proteína de soya y adición de probióticos.

	Dietas				
	DCML ^A	CPS30C ^B	CPS30Prob ^C	CPS60C ^D	CPS60Prob ^E
PI	152.6 ± 1.77	152 ± 1.9	153 ± 1.87	154.3 ± 2.068	153.1 ± 1.632
PF	618.4 ± 20.13 DE	624.4 ± 16.97 DE	645.4 ± 17.49 DE	260.1 ± 57.65 ABCE	406.2 ± 45 ^{ABCD}
PG	306.1 ± 3.59 ^{CDE}	312.5 ± 3.83 ^{ED}	323.5 ± 3.86 ^{ADE}	68.84 ± 0.94 ^{ABCE}	165.9 ± 1.76 ^{ABCD}
TEC	1.631 ± 0.03 ^{DE}	1.637 ± 0.02 ^{DE}	1.682 ± 0.02 ^{DE}	0.36 ± 0.22 ^{ABC}	1.002 ± 0.14 ^{ABC}
CTC	1.508 ± 0.03 ^{DE}	1.515 ± 0.03 ^{DE}	1.567 ± 0.03 ^{DE}	0.3445 ± 0.19 ^{ABC}	0.9079 ± 0.13 ^{ABC}
IDA	4.31	5.02	4.93	1.02	2.36
S	100	100	100	61.11	83.33
Aumento	4.05	4.11	4.22	1.69	2.65
PI					

Superíndices indican diferencias significativas (P < 0.05)

PI: peso inicial; PF: peso final; PG: peso ganado; TEC: tasa específica de crecimiento; CTC: coeficiente térmico de crecimiento; IDA: ingesta diaria de alimento; S: supervivencia

3.3. Calidad de tejidos

Al finalizar el segundo bioensayo de alimentación con totoaba, se sacrificaron de 2 organismos por cada dieta para analizar las diferencias en la firmeza del músculo, la cantidad de grasa visceral y condición de los tejidos internos como el hígado, bazo, vesícula biliar e intestino.

Los peces alimentados con las dietas con sustitución del 30% fueron los que presentaron una mejor firmeza y calidad de músculo en el filete con respecto a los peces alimentados con la dieta comercial y las

dietas de sustitución del 60%, que fueron las que tuvieron menor firmeza. Sin embargo, los peces alimentados con la dieta de sustitución de 60% adicionada con probiótico, obtuvieron una mejor calidad de filete, que los alimentados con la dieta con sustitución del 60% sin probiótico y una calidad similar a los alimentados con la de la dieta comercial.

Por otro lado, las dietas con diferente sustitución presentaron cantidades de grasa visceral similares, mientras que la dieta comercial presentó una mayor grasa visceral, además de presentar una coloración amarilla en la parte ventral del pez, con probable sintomatología de ictericia.

Aunado a lo anterior, las dietas con mayor sustitución presentaron hígados pálidos, bazo e intestino de menor tamaño. En el caso de la dieta con sustitución de 30% sin probiótico, presentó un hígado rosado, bazo y un intestino de tamaño medio. La dieta comercial, presentó un hígado rosado, un bazo pequeño y una longitud media del intestino. Los peces alimentados dieta con sustitución del 30% y adicionada con probiótico, presentó un hígado rosado con presencia de mayor irrigación de sangre a través del tejido y presentó el bazo e intestino de mayor tamaño entre las diferentes dietas.

Tabla 16. Parámetros cualitativos para la calidad de tejidos internos en totoaba, alimentadas con dietas con diferente sustitución y adición de probióticos.

Dieta	Firmeza del musculo	Grasa visceral	Observaciones en hígado, estomago, bazo e intestino
DCML	++	+++	-Hígado rosado (12.7 cm) -Bazo 1.05 cm -Longitud de intestino 18.7 cm (coloración oscura) -Bilis amarilla
CPS30C	+++	++	-Hígado rosado (12.35 cm) -Bazo 1.57 cm -Longitud de intestino 22.47 cm -Bilis amarilla
CPS30Prob	+++	++	-Hígado rosado (12.68 cm) -Bazo 1.76 cm -Longitud de intestino 24.74 cm -Bilis amarilla oscura
CPS60C	+	++	-Hígado pálido (11.16 cm) -Bazo 1.04 cm -Intestino 20.9 cm - Bilis amarilla
CPS60Prob	++	++	-Hígado pálido (10.4 cm) -Bazo 1.12 cm -Intestino 23.61 cm - Bilis amarilla

Finalmente, presentaron bilis con coloración amarilla, con excepción de los peces alimentación de la dieta con sustitución de 30% y adicionada con probiótico, que presentó bilis coloración amarilla más intensidad.



Figura 11. Peces alimentados con la dieta comercial con posible ictericia.

3.4. Ensayo preliminar de enfrentamiento contra patógenos, resistencia a oxigenación y compuestos nitrogenados

Como se mencionó en el apartado de metodología, para este ensayo preliminar, se tomaron 6 peces de las dietas DCML, CPS30C y CPS30Prob para ser infectados con bacterias de *Vibrio harveyi* para observar las diferencias en resistencia hacia el patógeno, a través de la dieta suministrada.

Durante los primeros días posteriores a la inyección intraperitoneal del patógeno, se observaron los patrones de movilidad de los peces, los cuáles en los primeros dos días, demostraron un patrón de movimiento lento con nado errático.

Sin embargo, fue hasta el tercer día en donde se logró observar una diferencia en la movilidad de los peces con respecto a la dieta suministrada y la cantidad de alimento consumido (Tabla 12; Figura 12). En este

sentido, la dieta adicionada con el probiótico fue la que obtuvo una rápida recuperación del patógeno con respecto a las dietas comercial y sustitución de 30% sin probiótico. La dieta que obtuvo una recuperación más lenta contra el patógeno fue la dieta comercial, ya que fue hasta el sexto día que se observó una movilidad normal en el nado de los peces de todas las dietas (Tabla 17).

Tabla 17. Movilidad en peces con respecto a días post- infección.

T (días)	Movilidad		
	DCML	CPS30C	CPS30Prob
1	°	°	°
2	°	°	°
3	°	°°	°°°
4	°	°°	°°°
5	°°	°°	°°°
6	°°°	°°°	°°°
7	°°°	°°°	°°°
8	°°°	°°°	°°°
9	°°°	°°°	°°°

°°° Movilidad alta, °° Movilidad media, ° Movilidad media

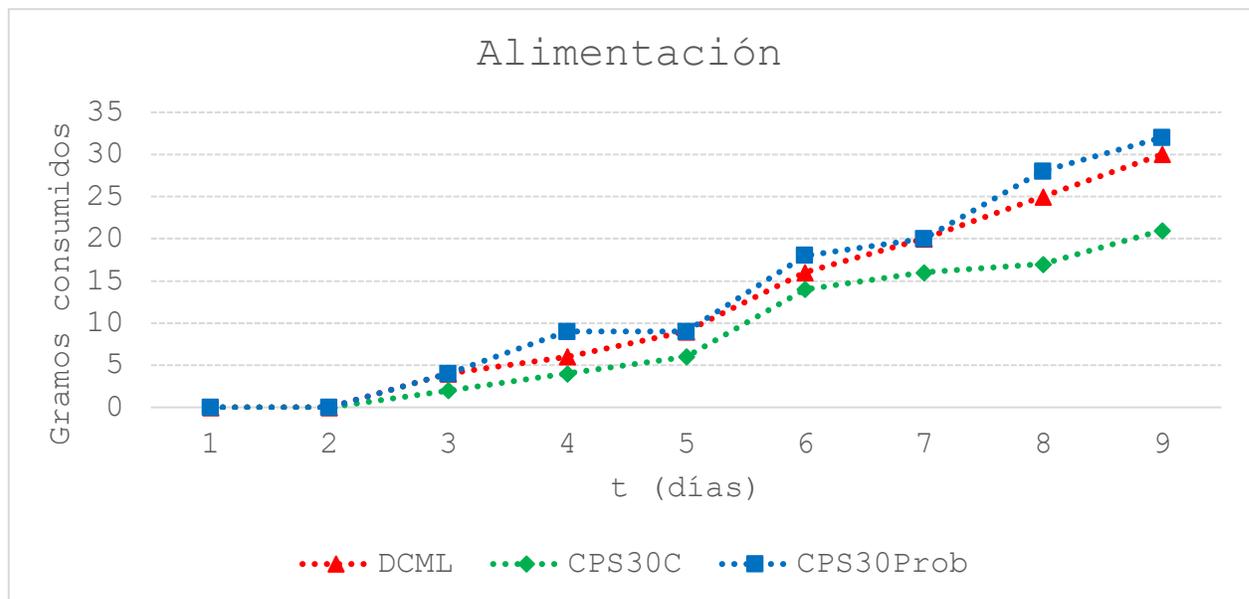


Figura 12. Consumo de alimento con respecto a días post-infección.

Por otro lado, durante el transcurso del experimento se tomaron los parámetros de amonio, nitritos y nitratos, para observar la resistencia de los peces con respecto a la dieta administrada.

Por parte del amonio, se logró registrar un incremento mayor sobre las dietas CPS30C y CPS30Prob con respecto a la dieta comercial, llegando a un máximo de 4 mg/l de amonio.

Esto nos puede indicar que los peces alimentados con las dietas de sustitución del 30% de harina de soya, utilizaron más la proteína contenida en el alimento que la dieta comercial, que probablemente utilizó más los lípidos, corroborando lo que se pudo observar con la cantidad de grasa visceral.

Para los parámetros de nitritos, estos se comportaron de manera similar durante el experimento, llegando a un máximo de 5 mg/l. Finalmente, no hubo registro de nitratos (Tabla 18).

Tabla 18. Parámetros de nitrógeno con respecto al tiempo post-infección.

t(días)	Amonio (mg/L)			Nitritos (mg/L)			Nitratos (mg/L)		
	DCML	CPS30C	CPS30Prob	DCML	CPS30C	CPS30Prob	DCML	CPS30C	CPS30Prob
1	0.25	0.25	0.25	0	0	0	0	0	0
2	0.25	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	0.5	0.5	0.5	0	0	0
4	2	4	4	1	1	2	0	0	0
5	2	4	4	2	2	2	0	0	0
10	2	4	4	5	5	5	0	0	0

Finalmente, con los peces recuperados de la infección por *Vibrio harveyi* y sometidos los ensayos de resistencia de compuestos nitrogenados, se prosiguió a realizar el ensayo de resistencia a oxigenación. Se cerró el flujo de oxigenación a cada tanque y se cronometró el tiempo de muerte de cada pez para posteriormente realizar una curva de supervivencia.

Para ello, los peces de la dieta CPS30C fueron los que tuvieron una menor resistencia a la falta de oxígeno con respecto a la dieta DCML y CPS30Prob. Sin embargo, los peces de la dieta que resistieron más tiempo a la falta de oxígeno fueron los alimentados con la dieta CPS30Prob (Figura 13).'

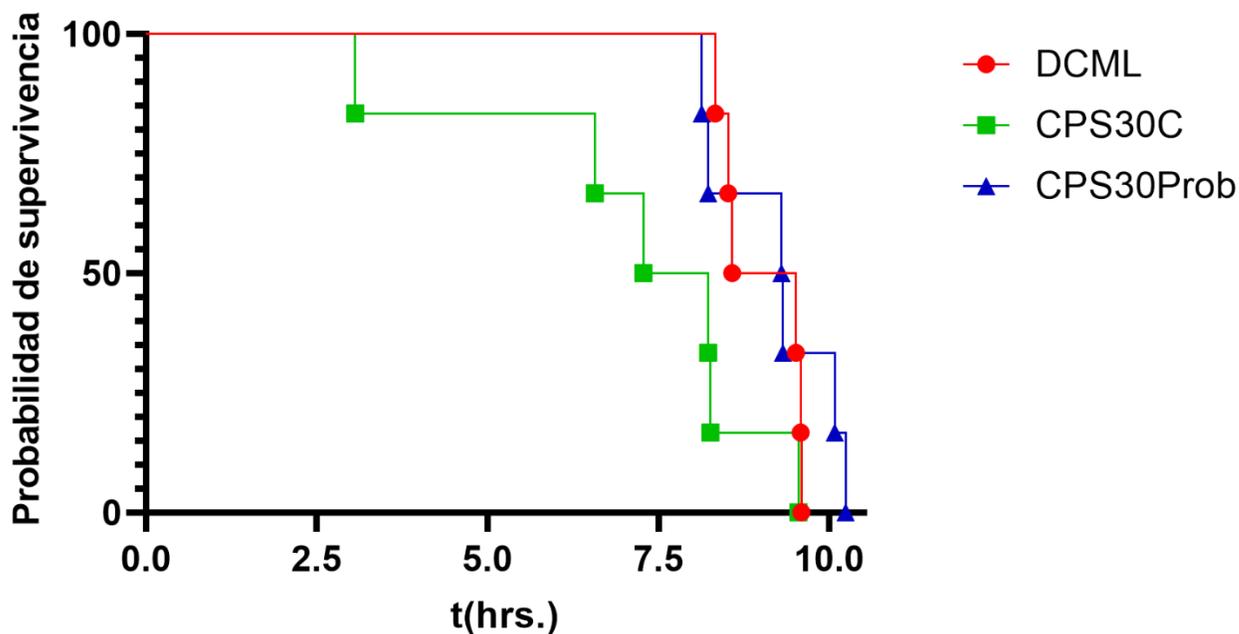


Figura 13. Curva de supervivencia de resistencia por falta de oxigenación.

3.5. Hibridación fluorescente In Situ (FISH) y DAPI

Para realizar poder realizar la técnica de FISH fue necesario sacrificar de manera humanitaria y tomar muestras de intestino distal al inicio (5 peces) y al final del segundo bioensayo (2 individuos por estanque) con la finalidad de observar cambios en la microbiota de la totoaba.

Para ello, estas muestras fueron suspendidas en 5 ml de formaldehido al 10% para llevar a cabo un proceso de homogenización.

Se prepararon alícuotas de 500 μ l de cada tejido para centrifugarlo a 14000 rpm durante 8 minutos. Los gránulos se lavaron dos veces en PBS filtrado en hielo (Tamaño de poro del filtro de 0.2 μ m) y se suspendieron en 1 ml de PBS.

También se realizaron las muestras controles, que consistieron cultivar *Bacillus subtilis* 9b y *Vibrio harveyii*. Estas cepas fueron cultivadas en medio Schaeffer con condiciones para alcanzar la fase de crecimiento exponencial media a 600 nm.

Se fijaron las muestras agregando formaldehído filtrado al 37%, a una concentración final de 6% para ser incubadas durante 1 hora a 4 ° C. Se colectó 1 ml de células fijas por centrifugación a 12000 × g durante 3 minutos. Los pellets se lavaron dos veces utilizando una solución salina tamponada con fosfato, enfriada con hielo (PBS: cloruro de sodio 120 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, tampón de fosfato 10 mM [pH 7,4]) para posteriormente ser resuspendidas en 1ml de PBS. Por último, las muestras se diluyeron a 1:4 con PBS.

A las muestras control, muestras iniciales y finales se tiñeron durante 5 minutos en la oscuridad usando 15 µl de solución de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 7,75 µg / ml en agua destilada filtrada a través de filtro de 0,2 µm) para la tinción DAPI.

Para la hibridación se realizaron diluciones en serie para distribuir alícuotas de 15 µl en portaobjetos de teflón de 12 pocillos y se incluyeron controles positivos. Los portaobjetos se dejaron secar a 37 °C y se trataron con solución de etanol / formaldehído (90:10) durante 5 minutos, para posteriormente enjuagarlas dos veces en agua destilada y secar a 37 °C.

Se añadieron 40 µl de mezcla de hibridación con 1 ng/µl de sondas a las muestras inmobilizadas en portaobjetos, evitando la formación de burbujas. La mezcla de hibridación contiene 10 × tampón SET (1 × SET: NaCl 150 mM, Tris - HCl 20 mM [pH 7,8], EDTA 1 mM), albúmina de suero bovino al 0,2% (p / v), ácido poliadenílico al 0,01% y 11% de sulfato de dextrano (9 p/v).

Los portaobjetos se colocaron en una cámara humidificada con trozos de papel saturado (1 × SET) y se incubaron durante toda una noche a 37 °C en oscuridad. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron 2 veces con 1 × tampón SET durante 1 minuto cada vez. Los portaobjetos se secaron en oscuridad y se añadió en cada pocillo, 5 µl de fluido de montaje (10x tampón SET, 50% de glicerol, 0.1% de p-fenilendiamono dihidroclorido). Finalmente, se aplicó un cubreobjetos a los portaobjetos para DAPI e hibridación, para analizar las muestras al microscopio utilizando un accesorio con filtros WU (395–440 nm: DAPI), MF (400–700 nm: 5 objetivos FITC o 5 (6) -ROX) y Plan Fluorita Universal.

Aunado a lo anterior, también se observaron los pozos en campo claro, de las muestras de intestino de la etapa final para la dieta de sustitución del 30% y adicionada con probiótico. En donde se observó claramente como el probiótico se fijó favorablemente al tejido del intestino de totoaba (Figura 14).

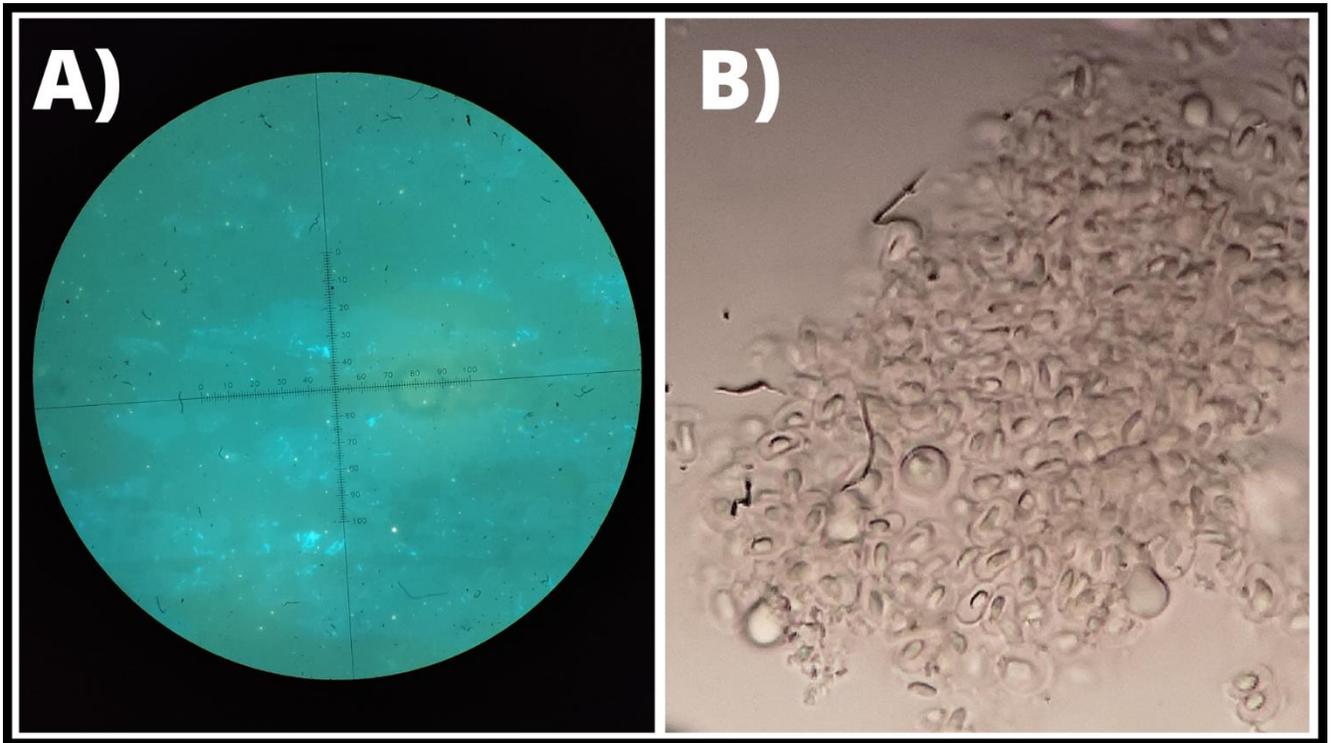


Figura 14. A) Tinción DAPI de muestras iniciales de intestino distal de totoaba. B) Probióticos adheridos a fragmento de tejido de muestras de intestino en etapa final de alimentación con dieta CPS30Prob.

3.5.1. Conteo de bacterias fluorescentes de campos obtenidos en pozos de laminillas

Como se mencionó en apartados anteriores, se contabilizaron 10 campos de las sondas de los grupos de Bajas en G+C y Gammas para las muestras de intestino en la etapa inicial, así como las muestras de intestino en la etapa final para los diferentes tratamientos. En tal sentido, se pudo observar un aumento en la concentración de bacterias pertenecientes al grupo de Bajas en G+C en las muestras de los peces alimentados con la dieta DC30Prob, durante las muestras de la etapa inicial a la final del segundo bioensayo.

Por otro lado, las bacterias del grupo de gammas, mismo al que pertenecen algunas de las bacterias patógenas para peces y humanos, disminuyeron en concentración desde las muestras de la etapa inicial a las de la final del segundo bioensayo. Para las muestras de los peces alimentados con la dieta control, se logró observar una ligera disminución en los grupos de bacterias gamma, mientras que la concentración de bacterias del grupo bajas en G+C se mantuvo similar. Para el caso de las muestras de los peces alimentados con la dieta comercial (DCML), presentaron las concentraciones más bajas de ambos grupos. Con base a estos resultados, se pudo inferir que además de que el probiótico pudo adherirse

correctamente al intestino de la totoaba, también logró modular la inducción de la microbiota benéfica, aunado con los resultados presentados con respecto al crecimiento y estatus de salud (Figura 15).

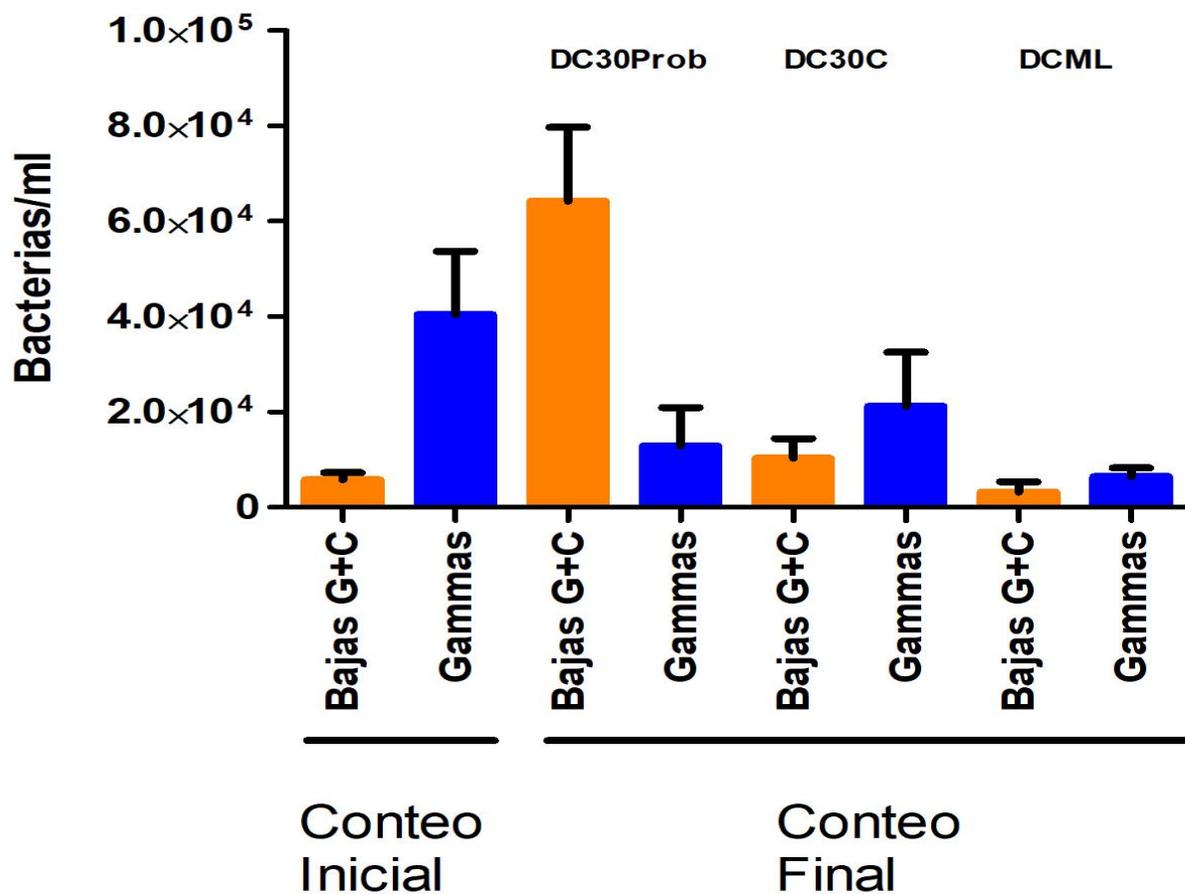


Figura 15. Conteo de bacterias fluorescentes en laminillas para los grupos bacterianos Bajas en G+C y Gammas para muestras iniciales y finales de intestino distal de totoaba.

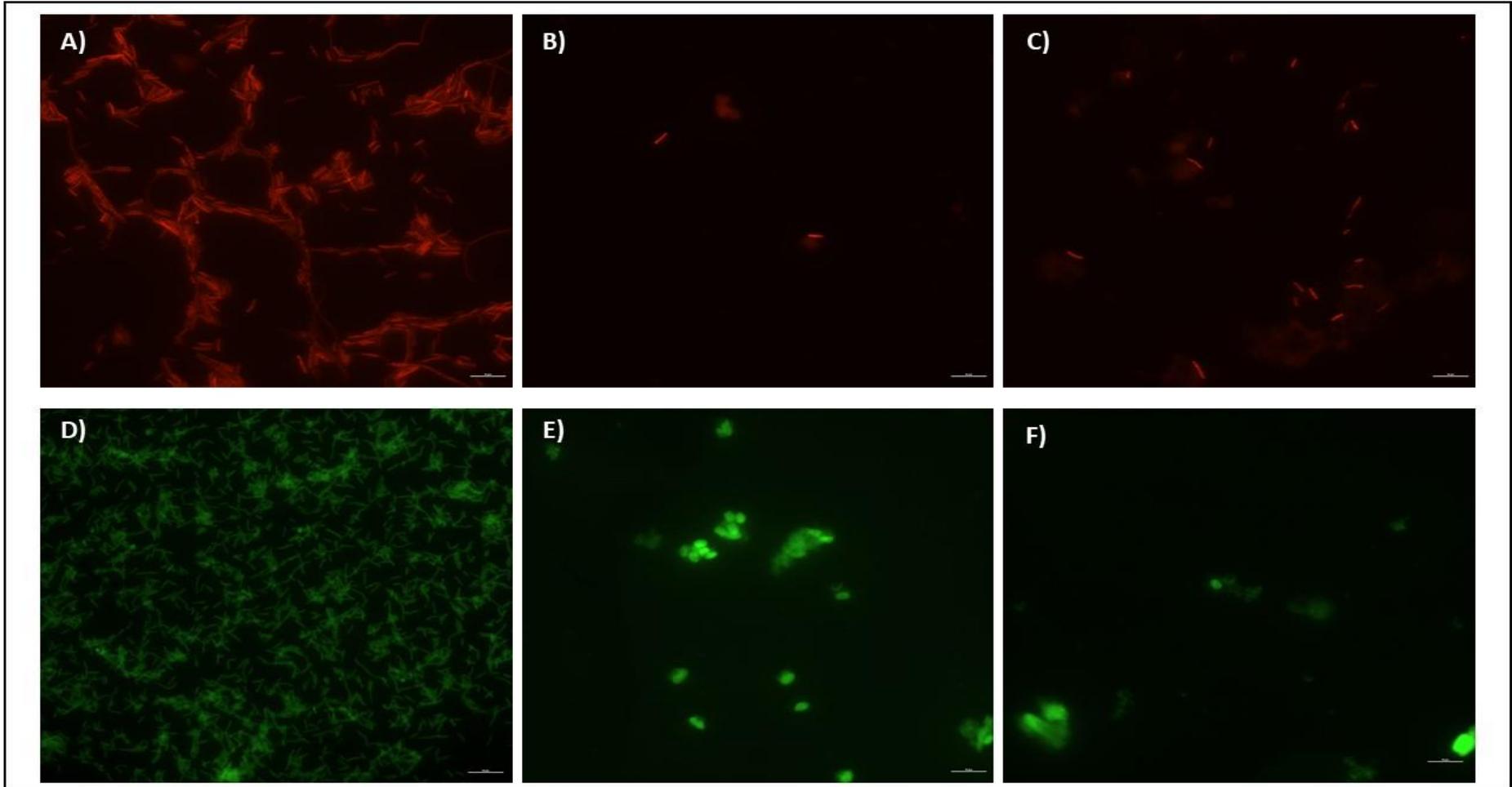


Figura 16. Resultados de la técnica FISH para las siguientes muestras: A) Muestra control para sonda de Bajas G+C (*Bacillus subtilis* 9b); B) Bacterias del grupo Bajas en G+C encontradas en muestras iniciales de intestino distal de totoaba; C) Bacterias del grupo Bajas en G+C encontradas en muestras intestino distal al concluir el experimento; D) Muestra control para sonda de Gammas (*Vibrio harveyi* ATCC 14126); E) Bacterias del grupo Gammas encontradas en muestras iniciales de intestino distal de totoaba; F) Bacterias del grupo Gammas encontradas en muestras intestino distal al concluir el experimento.

Capítulo 4. Discusión

4.1. Selección de candidatos a probióticos

El uso de probióticos del género *Bacillus* en el área de la producción acuícola ha generado un gran interés debido a que son excelentes candidatos para mejorar el status de salud y mejorar el aprovechamiento de los alimentos en los animales en cultivo. Las especies de *Bacillus* poseen una excelente capacidad fisiológica para producir diversas enzimas como lipasas, proteasas y amilasas que favorecen a la utilización del alimento y a la mejora en el crecimiento de los animales de cultivo. Además, de que son capaces de mejorar y modular la inmunidad a través de la producción de metabolitos y antibióticos para bloquear los mecanismos de inflamación en las infecciones patogénicas (Kuebutornye et al., 2019; Olmos-Soto et al., 2019, 2015; Soltani et al., 2019).

Durante el desarrollo de las pruebas para selección a candidatos a probióticos *in vitro* se pudieron seleccionar 2 cepas de *Bacillus subtilis* que fueron las que tuvieron mejor desempeño para las pruebas de actividad antimicrobiana contra posibles patógenos de totoaba, capacidad enzimática, hemólisis y resistencia a antibióticos.

Como se pudo observar en los resultados de la presente investigación, se lograron obtener dos cepas candidatas a probiótico, la primera de ellas que fue *B. subtilis 9b* la cual fue utilizada en investigaciones anteriores (Ochoa-Solano y Olmos-Soto, 2006) y *B. subtilis 9a*, obteniendo resultados similares.

4.1.1. Actividad antimicrobiana contra posibles patógenos de totoaba

Dentro de los resultados obtenidos durante el ensayo de actividad antimicrobiana contra posibles patógenos de totoaba, se pudo observar una actividad antimicrobiana favorable para ambas cepas de *B. subtilis*, siendo la cepa 9a la que obtuvo una mayor capacidad antimicrobiana para las cepas patógenas más fuertes (*V. harveyi*, *A. hydrophila*). Aunque no se realizaron análisis posteriores para identificar los metabolitos que causaron la inhibición de los patógenos, existen una gran cantidad de estudios que indican que las bacterias del género *Bacillus*, son capaces de producir metabolitos como enzimas, péptidos antimicrobianos, antibióticos y otras moléculas con capacidad antimicrobiana (Jeon et al., 2017; Perez et

al., 2020; Sharma et al., 2020). La inhibición de estas bacterias patógenas nos indica que tanto *B. subtilis* 9a y 9b producen alguno de estas moléculas antimicrobianas, sin embargo, se requiere realizar ensayos más específicos para conocer la naturaleza de los mismos y su correcta identificación.

4.1.2. Ensayo de capacidad enzimática

Detección de actividad de proteasas

Tras el uso de placas enriquecidas con concentrado de proteína de soya y placas con leche descremada, se logró detectar la actividad de las proteasas de ambas cepas de *Bacillus* (9a, 9b). Sin embargo, se pudo observar halos de degradación más grandes en medios enriquecidos con leche descremada con respecto a los medios enriquecidos con proteína de soya. Esto concuerda con los datos obtenidos en el estudio de Ochoa-Solano y Olmos-Soto (2006), en donde se utilizaron medios enriquecidos con leche descremada, harina de soya y harina de soya texturizada, obteniendo mejores resultados de degradación de proteasas en los medios enriquecidos con leche descremada, sin embargo, ambas cepas (9a y 9b) son capaces de degradar el concentrado de proteína de soya.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas constituyen el nutriente y la fuente de energía más importante para los peces debido que en su mayoría es digerida para la formación y reparación de tejido, sirven como sustrato para formación de lípidos y carbohidratos en tejido, además de utilizarse para la formación de hormonas, anticuerpos, enzimas y hemoglobina (Tacon, 1989).

Los peces carnívoros requieren entre 40 a 60% de proteína en su alimentación, por lo que la utilización de probióticos que logren generar una mejor biodisponibilidad y utilización de estas macromoléculas, representa un beneficio en la generación de dietas con sustitución de harina de pescado con más eficiencia y de bajo costo (Olmos-Soto et al., 2015).

Detección de carbohidrasas

Las placas enriquecidas con almidón permitieron detectar la actividad de las carbohidrasas producidas por las cepas de *B. subtilis* 9a y 9b. En este sentido la cepa 9b fue la que obtuvo un mejor crecimiento y mayor halo de degradación con respecto a la cepa 9a, sin embargo, ambas cepas fueron capaces de degradar el almidón.

Aunque se tiene bien estudiado que los peces carnívoros solo pueden digerir parcialmente hasta un 10% de carbohidratos en alimentos, estos son una fuente económica de energía que al ser utilizados adecuadamente junto con probióticos que producen carbohidrasas, pueden ser sustituidos por proteína, generando mejores eficiencias y parámetros de salud y crecimiento en peces (López, Olmos-Soto, Trejo-Escamilla, et al., 2016; Olmos-Soto, 2017; Tacon, 1989).

Estos resultados obtenidos, permitieron reformular las dietas utilizadas durante el segundo bioensayo de alimentación con totoaba.

Además, estos resultados coinciden con los obtenidos por Ochoa-Solano (2006), en donde se probaron las mismas cepas en medios cromogénicos X- α -Glu y α -X-Gal, donde ambas cepas fueron positivas para los medios con amilosa y X- α -Glu y amilopectina y X- α -Glu.

Detección de lipasas

En estudios anteriores se ha logrado reportar la producción de lipasas extracelulares en especies del género *Bacillus* (Kennedy y Lennarz, 1979; Lesuisse et al., 1993). En este sentido, tras utilizar medios enriquecidos con aceite de soya y rodamina, se lograron observar resultados positivos para la producción de lipasas, concordando con los resultados obtenidos en Ochoa-Solano en 2006.

4.1.3. Ensayo de hemólisis

Uno de los requisitos más importantes para seleccionar un candidato a probiótico es que este no presente toxinas hemolíticas que puedan afectar al hospedero. Sin embargo, existen varios estudios que indican que algunas especies de *Bacillus* como *B. cereus* o *B. anthracis* producen toxinas hemolíticas y son causantes de enfermedades graves como el ántrax o problemas eméticos y diarreicos (McKillip, 2000).

En este sentido, se realizó el ensayo de hemólisis para las cepas de *Bacillus subtilis* 9a y 9b en medios con agar-sangre, en donde no se registró halos de degradación. Esto nos indicó que ambas cepas son seguras de utilizarse dentro de los alimentos.

4.1.4. Ensayo de resistencia a antibióticos

El ensayo de sensibilidad contra antibióticos fue realizado para ambas cepas de *B. subtilis* (9a y 9b). Se logró detectar que ambas cepas fueron sensibles a todos los antibióticos utilizados para estos ensayos.

El uso indiscriminado de antibióticos genera una presión selectiva para las bacterias, generando nuevas cepas resistentes a los antibióticos. Además, su uso en cultivos de peces causa impactos en el ecosistema acuático natural, afecta al balance de la microbiota del sistema digestivo, disminuye la capacidad inmune y promueve las enfermedades en el hospedero (Banerjee et al., 2017).

4.1.5. Curvas de crecimiento bacteriano

Una vez realizados los ensayos para la selección de las cepas a utilizar como probióticos, se realizó la curva de crecimiento para las cepas 9a y 9b para conocer su comportamiento en medios de esporulación Schaeffer. Ambas cepas presentaron un crecimiento hasta la fase estacionaria en un periodo de 8 horas. Esto permitió poder realizar la obtención de las muestras control para la metodología de FISH, las cuáles requieren obtener la muestra a la mitad de la fase exponencial de crecimiento.

4.2. Bioensayos de alimentación con totoaba

4.2.1. Primer bioensayo de alimentación de totoaba

La harina de soya ha sido de las fuentes de proteína más estudiadas para alimentos para peces debido a que contiene perfiles de proteína y aminoácidos favorables (López et al., 2015; Mcgoogan and Gatlin, 1997; Olmos-Soto et al., 2015).

No obstante, la harina de soya contiene factores antinutricios que impiden una correcta digestibilidad causando efectos adversos a la salud, lo que ha generado una controversia sobre el uso de estas harinas en la alimentación de peces carnívoros.

Por otro lado, algunos otros estudios mediante la utilización de concentrado de proteína de soya y sustitución de harina de pescado, indican eficiencias en digestibilidad, crecimiento y estatus de salud, similares a dietas comerciales o sin sustitución (López et al., 2015; Trejo-Escamilla et al., 2017).

En este primer bioensayo se evaluó el desempeño en el crecimiento de totoaba en un experimento con diferentes sustituciones de concentrado de proteína de soya y adición de probióticos en el alimento durante un periodo de 12 semanas. Se pudieron observar desempeños de crecimiento (PG, TEC, CTC) y utilización del alimento (IDA) similares para las dietas control y sustitución de 30%, mientras que la dieta control con probiótico y sustitución de 60% presentaron valores más bajos respectivamente. Las dietas sin sustitución con y sin probiótico y sustitución del 30% aumentaron en promedio 3.71 veces su peso inicial, mientras que la dieta con mayor sustitución (DC60) aumentó 2.51 veces su peso inicial.

Aunque se esperaba un mejor desempeño de la dieta control con probiótico, con respecto a su contraparte (DC0), se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso ($P=0.12$). Esto, posiblemente debido a una inhibición del probiótico por la cantidad de nitrógeno contenido en la harina de pescado, ya que este probiótico es capaz de generar mejores rendimientos y producir enzimas que hidrolizan ingredientes de origen vegetal como en la dieta de sustitución del 30% (Olmos-Soto et al., 2011).

Por otro lado, la dieta con mayor sustitución fue la que obtuvo un menor rendimiento de crecimiento y supervivencia. Trejo-Escamilla y colaboradores en 2017, indican que la sustitución óptima de concentrado de proteína de soya por harina de pescado, para obtener desempeños de crecimiento favorables es del 34.17%, por lo que es posible que aún con la adición de la cantidad del probiótico en esta dieta, se repitieran resultados similares.

Al no observar diferencias significativas y el efecto óptimo del probiótico adicionado a la dieta con respecto al crecimiento de la totoaba, se propuso reformular nuevamente las dietas de sustitución de 30% y 60% para ser utilizadas durante el segundo bioensayo.

4.2.2. Segundo bioensayo de alimentación de totoaba

La capacidad de los peces para digerir y metabolizar eficientemente los carbohidratos es variable y se han considerado intolerantes a la glucosa debido a su incapacidad enzimática para restaurar los niveles de glicemia posterior al consumo (Polakof et al., 2012). No obstante, aunque los peces presenten una baja

tolerancia hacia los carbohidratos, la energía obtenida de los mismos puede ser utilizada una vez digerida en azúcares (Olmos-Soto et al., 2019).

Un estudio realizado por López y colaboradores en 2016, en donde evaluaron el incremento en la proporción de carbohidratos por lípidos en dietas adicionadas con *Bacillus subtilis* en corvina blanca, un pez de la misma familia que la totoaba, mostró rendimientos significativos en el desempeño de crecimiento, digestibilidad y utilización del alimento a partir del 18% de inclusión de carbohidratos.

Aunado a lo anterior, a los resultados obtenidos con *B. subtilis 9b* en los ensayos de capacidad enzimática durante la selección de candidatos a probióticos y al no obtener los resultados esperados durante el primer bioensayo, se decidió volver a reformular las dietas con sustitución del 30% y 60% con un incremento del 18% en el contenido de almidón.

Como se pudo observar en el apartado de resultados, la dieta con sustitución del 30% y adicionada con probióticos, fue la que obtuvo un mayor peso ganado con respecto a su control y la dieta comercial (Tabla 15). Se pudo observar que esta dieta aumentó 4.22 veces su peso inicial, logró obtener un 5.3% mejor eficiencia en crecimiento y una utilización del alimento muy cercana a la dieta comercial de la marca Skretting® (DFI 4.31 y 4.93 respectivamente). Con respecto a su control (CPS30C), la dieta CPS30Prob obtuvo un 3.4% mejor rendimiento en crecimiento y una utilización-asimilación del alimento muy similar (DFI 5.02 y 4.93 respectivamente). Aunado a lo anterior, la dieta CPS30Prob obtuvo un 11.4% y 13.19% mayor crecimiento que las dietas control y sustitución del 30% con probiótico del primer bioensayo respectivamente.

Por otro lado, aunque en los parámetros de la tasa específica de crecimiento no se encontraran diferencias significativas, se pudo observar que la dieta CPS30Prob adicionada con probióticos mostró efectos acumulativos en crecimiento y salud durante el transcurso del bioensayo (Tabla 15). Asimismo, se puede observar que la dieta CPS30C también presentó un mejor desempeño de crecimiento que la dieta comercial (Tabla 15).

Para el caso de las dietas con mayor sustitución de CPS, ambas presentaron un menor desempeño en crecimiento y supervivencia que la dieta comercial y las sustituciones del 30% con y sin probiótico. No obstante, los peces alimentados con la dieta CPS60Prob presentó un 58.5% mejor eficiencia en crecimiento y mejor porcentaje de supervivencia que su control CPS60C, además de observarse un mejor aprovechamiento del alimento. En este sentido, en la dieta CPS60Prob fue posible observar un mejor

desempeño del probiótico y al parecer, hubo una mejor utilización de la proteína proveniente del concentrado de soya, quizás por una disminución en la represión del probiótico por el nitrógeno proveniente de la harina de pescado. Sin embargo, los parámetros evaluados presentaron valores más bajos con respecto a la dieta CPS30Prob, ya que al aumentar la cantidad de CPS también se aumenta la cantidad de los inhibidores de proteasas.

Considerando eficiencia, desempeño y posible disminución en costo de producción de la dieta CP30Prob, podemos mencionar que esta dieta es mejor que la dieta comercial evaluada. Sin embargo, es posible que se requiera reformular nuevamente la dieta y/o el bioaditivo con el probiótico, ya que consideramos que todavía se pueden obtener mejores resultados a mejores precios y sin afectar la salud de los animales principalmente para las dietas con mayor contenido de CPS.

Fuentes- Quesada y colaboradores en 2018, indican que inclusiones superiores al 22% de harinas de soya en la dieta perjudican la fisiología digestiva de la totoaba, sin embargo, en este trabajo los peces alimentados con las dietas con sustitución del 30% de sustitución por concentrado de proteína de soya, tanto la dieta control como la dieta con probiótico, no presentaron afecciones en la fisiología digestiva (Tabla 16). Queda pendiente evaluar los efectos de la harina de soya cuando se agrega el probiótico utilizado en estos experimentos.

Por otro lado, el estudio de Trejo- Escamilla y colaboradores en 2017 indican que el máximo de sustitución de concentrado de proteína de soya máximo permitido para la totoaba es del 34.17% sin que se presenten problemas de salud en los animales. En este sentido, este trabajo corrobora esos resultados, sin embargo, es importante resaltar que las dietas CPS30Prob y CPS60Prob presentan un 43% y un 15% mejor rendimiento en aumento de peso que las dietas SCP30 y SCP60 respectivamente (Tabla 15). Esto indica que la adición de probióticos aun en concentraciones del 30% o más de CPS, permiten mejorar considerablemente los parámetros productivos.

En otro estudio con totoaba realizado por González-Felix y colaboradores utilizaron una dieta con concentraciones de soya de 21.81 g/100g, adicionada con el probiótico Aquablend[®] el cual contiene *Bacillus*, los resultados obtenidos demuestran que los animales no aumentaron su peso en un periodo de 109 días, mientras que los animales tratados con las dietas CPS30Prob y CPS60Prob aumentaron su peso inicial 4.22 y 2.65 veces en un periodo de 3 meses. En este sentido los experimentos desarrollados en nuestro trabajo son contundentes en exponer los beneficios de las dietas producidas y los efectos positivos de los probióticos en la utilización del concentrado de soya.

4.2.3. Calidad de tejidos

El uso de probióticos suplementados en la alimentación ha demostrado mejoras en la calidad de los tejidos. Estudios como el de Cao y colaboradores y Yang y colaboradores en 2019, indican que la suplementación de probióticos del género *Bacillus* a la alimentación, generan beneficios en la dureza, gomosidad, masticabilidad, resiliencia y calidad del filete en la carpa cruciana de Pengze. En este sentido, nuestros resultados indicaron que la dieta CPS30Prob mostró una mejor calidad en la firmeza, masticabilidad y calidad del tejido, cantidad de grasa visceral y el estado de los órganos internos con respecto a la dieta comercial y al control CPS30C (Tabla 16). Como se pudo observar en los resultados, la dieta comercial presentó la mayor cantidad de grasa visceral y una firmeza media en el filete, posiblemente debido a la cantidad de lípidos que contiene. Aunado a lo anterior, se pudo observar la presencia de ictericia en la parte ventral de algunos peces, pudiendo ser signo de varios problemas de salud como daños en el hígado y en la vesícula biliar ocasionados por el exceso de lípidos.

Algunos trabajos de investigación como el de Adorian y colaboradores en 2019, indican en sus resultados que la suplementación de probióticos del género *Bacillus* a una concentración de 10^6 UFC, optimizó la disponibilidad de nutrientes en dietas para el pez *Lates calcarifer* priorizando la deposición de proteínas en detrimento a la deposición de lípidos. Estos resultados indican un mejor aprovechamiento e integración de la proteína incluida en la dieta. Con base a nuestros resultados obtenidos en la calidad de los tejidos, nuestra dieta CPS30Prob presentó una mejor inclusión de las proteínas de la dieta en musculo y una menor inclusión de los lípidos, pudiendo observar una mejor calidad en el filete y una menor cantidad de grasa visceral. Estos resultados nos indican que los probióticos del género *Bacillus* son capaces de incrementar la asimilación de la energía disponible en las dietas, y dirigirla hacia la producción de tejidos que favorecen la calidad y firmeza del filete.

4.3. Ensayo preliminar de enfrentamiento contra patógenos, resistencia a oxigenación y compuestos nitrogenados

Como se mencionó en el apartado inicial del presente estudio, se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* cuentan con diversos mecanismos que permiten mitigar los efectos de los patógenos en peces de cultivo (Kuebutornye et al., 2019). En este sentido, nuestros resultados *in vitro* y nuestros

resultados preliminares *in vivo*, nos muestran que el probiótico *Bacillus 9b*, cuenta con la capacidad de inhibir a patógenos como *Vibrio harveyi*, generando un mejor estatus de salud y movilidad de los peces tras un proceso de infección. En este sentido, la dieta CPS30Prob presentó un mejor desempeño con respecto a la dieta control y la dieta comercial (Tabla 17, figura 12), permitiendo una recuperación más rápida y una mayor resistencia hacia la infección del patógeno, sin embargo, es necesario determinar la dosis letal media del patógeno en *Totoaba macdonaldi*.

Los estudios de evaluación de estrés en animales de cultivo acuáticos, se encuentran dirigidos a evaluar los efectos benéficos de la suplementación de probióticos en las mejoras del estatus de salud durante condiciones de estrés (Truong Thy et al., 2017). Los niveles de amonio dentro de un cultivo son indicadores de producción excesiva de heces, restos de alimento, sistemas intensivos de crianza y falta de recambio de agua que provocan un deterioro en la calidad del ambiente acuático. Estos desbalances en el nivel de amonio en el agua, son capaces de provocar daños en respiración, la osmorregulación, la respuesta inmune y el estrés oxidativo en los peces de cultivo (Abdel-Tawwab et al., 2020).

Existen diversos estudios que evalúan el desempeño en condiciones de estrés en animales acuáticos cultivados y suplementados con probióticos del género *Bacillus* en la alimentación, en los cuales se muestra una mejor resistencia hacia los efectos de concentraciones de amonio. Estudios en el pez gato rayado y el camarón blanco del Pacífico, suplementados con probióticos de *Bacillus*, indican una mejor adaptación y supervivencia a condiciones altas de amonio en el agua (Olmos-Soto et al., 2019, 2011; Truong Thy et al., 2017). Sin embargo, aunque no se logró observar mortalidad por los efectos de la concentración de amonio en el agua en este ensayo preliminar, es necesario realizar estudios sobre la dosis letal media de amonio en la totoaba. Por otro lado, es importante mencionar que los peces de las dietas con sustitución del 30% de CPS, presentaron concentraciones más elevadas de amonio en el agua, indicando que se favoreció la digestibilidad de la proteína contenida en la dieta, favoreciendo la tasa de crecimiento y la calidad del filete de los mismos.

Con respecto a la dieta comercial, esta presentó los niveles más bajos de concentraciones de amonio durante este experimento. Aunado a los resultados de la calidad de tejidos, en donde los peces alimentados con esta dieta presentaron mayor grasa visceral, podemos deducir que la utilización de esta dieta, favorece la digestibilidad y acumulación de grasa en tejidos y vísceras de la totoaba. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que puedan confirmar estos supuestos.

El estrés causado por bajos niveles de oxígeno en los sitios de cultivo, es capaz de causar una reducción en la respuesta inmune innata, un incremento sustancial en los niveles de cortisol, proteínas de choque térmico (Hsp), glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, las cuales cumplen la función de mantener los procesos de homeostasis en condiciones de estrés en peces.

Estudios en el campo de la probiosis en animales de importancia acuícola, como lo es el camarón y la perca amarilla, indican una mejor respuesta hacia el estrés en condiciones de hipoxia.

Eissa y colaboradores en 2018, indican en sus resultados que la perca amarilla que se sometió a hipoxia experimental y exposición al aire, con una mezcla de *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliqueficiens* y *B. licheniformis*, mostró una disminución significativa en los niveles plasmáticos de cortisol en comparación con el control en condiciones de hipoxia. Por otro lado, Olmos-Soto y colaboradores en 2011, indican en sus resultados, un mejor desempeño contra el estrés por hipoxia y metabolitos de la hemolinfa en dietas suplementadas con *B. subtilis* en el camarón blanco del Pacífico.

En este sentido, aunque en nuestro ensayo preliminar no se logró analizar los metabolitos relacionados a la respuesta inmune innata y estrés a hipoxia, la dieta de sustitución del 30% y adicionada con el probiótico *B. subtilis* 9b (CPS30Prob), presentó un mejor desempeño en la resistencia a hipoxia con respecto a la dieta comercial y la dieta control (DCML y CPS30C). Suponemos que estos resultados preliminares, nos pueden estar indicando que el probiótico de *Bacillus* adicionado a esta dieta, es capaz de contribuir en los procesos de homeostasis en condiciones de hipoxia en la totoaba, sin embargo, se requiere realizar más estudios que permitan confirmar este supuesto.

4.4. Hibridación fluorescente In Situ (FISH) y DAPI

La hibridación fluorescente in situ es una técnica comúnmente utilizada para analizar las comunidades de bacterias gastro intestinales. Esta metodología se basa en la hibridación de sondas de oligonucleótidos sintéticos en regiones específicas dentro del ribosoma bacteriano y se puede utilizar para muestras de tejido o heces (Ibrahem, 2013). Dentro de las ventajas en utilizar esta técnica, se encuentran la detección de células individuales activas metabólicamente en medios complejos, clasificación e identificación filogenética de las mismas y la detección de bacterias no cultivables (Garcia-Triana y Olmos-Soto, 2007; Olmos-Soto, 2021).

Con el objetivo de poder observar una inducción de la microbiota benéfica en totoabas suplementadas con probióticos en la dieta, se realizó una hibridación fluorescente In Situ con muestras de intestino distal. Las muestras fueron tomadas al inicio y al finalizar el segundo bioensayo de alimentación.

En la presente metodología, se corroboró que el proceso del tratamiento de los tejidos, homogenizado y los procesos de dilución a 0.25x, son los adecuados para obtener una muestra para la identificación de bacterias para la metodología de FISH. Resultados similares se han observado en trabajos previos con un tratamiento similar de las muestras (García-Triana, 2005; Hernández-Zárate y Olmos-Soto, 2006; Padilla-Sánchez, 2005).

Durante la visualización de las muestras iniciales y finales, se obtuvieron imágenes en diez campos por cada pozo ($19,635,000 \mu\text{m}^2$) para las muestras de bacterias con los oligos de bajas en G+C y gammaproteobacteria.

Dentro de los resultados obtenidos se pudo observar una menor concentración de bacterias pertenecientes al grupo de bajas en G+C y una mayor concentración de las pertenecientes al grupo de gammaproteobacteria en las muestras iniciales (5.8×10^3 y 4.04×10^4 UfC respectivamente) (Figura 15).

Por otro lado, los resultados para las muestras obtenidas al finalizar el segundo bioensayo de alimentación, muestran una mejora en las concentraciones de bacterias pertenecientes al grupo de bajas en G+C (6.42×10^4 UFC) y una disminución en las pertenecientes al grupo de gammaproteobacteria (1.28×10^4 UFC) en las muestras de peces alimentados con la dieta DC30Prob, con respecto las muestras iniciales ($P=0.0055$ y $P=0.29$ respectivamente) (FIGURA #).

También, en las muestras de peces alimentados con la dieta control (DC30C) se logró observar una ligera disminución en los grupos de bacterias gamma, mientras que la concentración de bacterias del grupo bajas en G+C se mantuvo similar con respecto a las muestras iniciales, indicando que no hubo un cambio significativo en las concentraciones de este grupo con respecto a las muestras iniciales.

Por otro lado, las muestras de los peces alimentados con la dieta comercial (DCML) mostraron los niveles más bajos de ambos grupos bacterianos (Figura 15). En este sentido, es posible que, en los peces alimentados con la dieta comercial, presenten concentraciones mayores de otros grupos bacterianos o quizás estas dietas contengan en su formulación algún tipo de bactericida, sin embargo, se requiere analizar con oligos de otros grupos bacterianos, para dejar en claro tal supuesto.

Cabe mencionar que, durante la observación de las muestras en campo claro y FISH, se logró observar conglomerados de bacterias adheridas a tejido, las cuales no facilitaron su contabilización. Es probable que se requiera modificar el protocolo del tratamiento de las muestras de tejido, para así poder disgregar estos paquetes bacterianos y permitan una mejor contabilización de estas células individuales (Figura 16).

Sin embargo, estos resultados obtenidos mediante la técnica FISH, la de selección de probióticos y bioensayos de alimentación, nos permiten deducir que el probiótico *Bacillus subtilis* 9b, adicionado a dietas, logra adherirse a las paredes intestinales, modulando la flora bacteriana y generando beneficios en crecimiento, salud y calidad de los tejidos en *Totoaba macdonaldi*.

Capítulo 5. Conclusiones

Las cepas de *B. subtilis* 9a y 9b, presentaron capacidad de inhibición de patógenos potenciales para la totoaba, producción de enzimas digestivas y no presentaron hemólisis ni resistencia a antibióticos, haciéndolas buenas candidatas a probióticos.

Durante el segundo bioensayo de alimentación de totoaba, los peces alimentados con la dieta con sustitución del 30% y adicionada con probióticos (CPS30Prob), fueron los que obtuvieron un mayor peso ganado con respecto a su control (CPS30C) y la dieta comercial (DCML). Se observó que los peces alimentados con esta dieta (CPS30Prob) aumentaron 4.22 veces su peso inicial, logrando obtener un 5.3% mejor eficiencia en crecimiento y una utilización del alimento muy cercana a la dieta comercial de la marca Skretting® (DFI 4.31 y 4.93 respectivamente). Los peces alimentados con CPS30Prob obtuvieron un 3.4% mejor rendimiento en crecimiento y una utilización del alimento muy similar con respecto a su control (CPS30C) (DFI 4.93 y 5.02 respectivamente).

También, los peces alimentados con CPS30Prob obtuvieron un 11.4% y 13.19% mayor crecimiento que las dietas control y sustitución del 30% con probiótico del primer bioensayo respectivamente.

Por otro lado, los peces alimentados con CPS60Prob presentaron un 58.5% mejor eficiencia en crecimiento y porcentaje de supervivencia que su control (CPS60C), además de obtener un mejor aprovechamiento del alimento (DFI= 2.36 y DFI= 1.02 respectivamente). En la dieta CPS60Prob fue posible observar un mejor desempeño del probiótico adicionado a la dieta, mediante una mejor utilización de la proteína proveniente del concentrado de proteína de soya.

Es importante mencionar que se requiere reformular nuevamente la dieta CPS60Prob y/o el bioaditivo con el probiótico, con el objetivo de inducir una mejor utilización del concentrado de proteína de soya y reducir los efectos de la misma en esta dieta.

Una inclusión del 18% de almidón y la suplementación del probiótico *Bacillus* 9b en dietas para la totoaba, es capaz de generar mejoras en el crecimiento y engorda de la totoaba, aun cuando se sustituyan los porcentajes de harina de pescado por concentrado de proteína de soya.

Para los análisis de la calidad de tejidos, los peces alimentados con la dieta con sustitución del 30% de concentrado de proteína de soya y adicionada con probiótico (CPS30Prob), mostraron una mejor calidad

en la firmeza, masticabilidad y calidad del tejido, cantidad de grasa visceral y el estado de los órganos internos con respecto a la dieta comercial.

La dieta comercial (DCML) presentó la mayor cantidad de grasa visceral y una firmeza media en el filete, posiblemente debido a que esta dieta dirige el aprovechamiento de la dieta, favoreciendo la utilización de los lípidos, sin embargo, es necesario realizar estudios específicos para corroborar estos supuestos.

Se pudo observar la presencia de ictericia en la parte ventral de algunos peces de la dieta comercial, pudiendo ser signo de varios problemas de salud como daños en el hígado.

Los probióticos del género *Bacillus* son capaces de ayudar a dirigir el aprovechamiento de la energía disponible en las dietas, hacia la producción de tejidos que favorecen la calidad y dureza del filete.

Para los ensayos preliminares de enfrentamiento contra patógeno, resistencia a amonio y estrés por oxigenación, podemos concluir que los peces alimentados con la dieta CPS30Prob presentaron un mejor desempeño con respecto a la dieta control y la dieta comercial, permitiendo una recuperación más rápida y una mejor resistencia hacia la infección del patógeno, sin embargo, es necesario determinar la dosis letal media del patógeno en *Totoaba macdonaldi*.

No se logró observar mortalidad por los efectos de la concentración de amonio en el agua en este ensayo preliminar, por lo que es necesario realizar estudios sobre la dosis letal media de amonio en la totoaba.

Los peces alimentados con la dieta de sustitución del 30% y adicionada con el probiótico *B. subtilis* 9b (CPS30Prob), presentaron un mejor desempeño en la resistencia a hipoxia con respecto a la dieta comercial y la dieta control (DCML y CPS30C).

Con respecto a las metodologías de FISH y DAPI realizadas para las muestras de intestino distal en totoabas suplementadas con el probiótico *B. subtilis* 9b, podemos concluir que el proceso del tratamiento de los tejidos, homogenizado y los procesos de dilución a 0.25x, son los adecuados para obtener una muestra para la identificación de bacterias para la metodología de FISH, sin embargo, es necesario modificar el protocolo para poder disgregar mejor las bacterias, para mejorar la contabilización de las mismas.

Se observó una menor concentración de bacterias pertenecientes al grupo de bajas en G+C y una mayor concentración de las pertenecientes al grupo de gammaproteobacteria en las muestras iniciales.

Las muestras obtenidas al finalizar el segundo bioensayo de alimentación, muestran un aumento en las concentraciones de bacterias pertenecientes al grupo de bajas en G+C y una disminución en las pertenecientes al grupo de gammaproteobacteria con respecto las muestras iniciales, indicando una modulación de bacterias por parte del probiótico.

Finalmente, con base a las conclusiones anteriores, podemos decir, que la suplementación de bacterias probióticas del género *Bacillus* en dietas para peces como la totoaba, genera beneficios en salud, crecimiento, calidad de tejidos y modulación de la microbiota benéfica, así como una mejor rentabilidad en los costos de la producción de dietas con sustituciones por harinas vegetales.

Literatura citada

- Abdel-Tawwab, M., Monier, M. N., Abdelrhman, A. M., Dawood, M. A. O. 2020. Effect of dietary multi-stimulants blend supplementation on performance, digestive enzymes, and antioxidants biomarkers of common carp, *Cyprinus carpio* L. and its resistance to ammonia toxicity. *Aquaculture*, 528, 735529. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735529
- Addo, S., Carrias, A. A., Williams, M. A., Liles, M. R., Terhune, J. S., Davis, D. A. 2017. Effects of *Bacillus subtilis* Strains on Growth, Immune Parameters, and *Streptococcus iniae* Susceptibility in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(2), 257–267. doi:10.1111/jwas.12380
- Adorian, T. J., Jamali, H., Farsani, H. G., Darvishi, P., Hasanpour, S., Bagheri, T., Roozbehfar, R. 2019. Effects of Probiotic Bacteria *Bacillus* on Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, and Hematological Parameters of Asian Sea Bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(1), 248–255. doi:10.1007/s12602-018-9393-z
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., Mohsin, M. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 733–741. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.038
- Arriaga-Hernández, D., Hernández, C., Martínez-Montaña, E., Ibarra-Castro, L., Lizárraga-Velázquez, E., Leyva-López, N., Chávez-Sánchez, M. C. 2021. Fish meal replacement by soybean products in aquaculture feeds for white snook, *Centropomus viridis*: Effect on growth, diet digestibility, and digestive capacity. *Aquaculture*, 530(August 2020), 735823. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735823
- Baindara, P., Mandal, S. M., Chawla, N., Singh, P. K., Pinnaka, A. K. 2013. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. 1–11.
- Banerjee, G., Nandi, A., Ray, A. K. 2017. Assessment of hemolytic activity, enzyme production and bacteriocin characterization of *Bacillus subtilis* LR1 isolated from the gastrointestinal tract of fish. *Archives of Microbiology*, 199(1), 115–124. doi:10.1007/s00203-016-1283-8
- Baquero, F., Martínez, J. L., Cantón, R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265. doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006
- Barange, M. 2018. Fishery and aquaculture statistics. *FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics= FAO Annuaire. Statistiques des Peches et de l'Aquaculture= FAO Anuario. Estadísticas de Pesca y Acuicultura*, 1-82
- Barreto-Curiel, F., Ramirez-Puebla, S. T., Ringø, E., Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E., Vazquez-Duhalt, R., Sanchez-Flores, A., Viana, M. T. 2018. Effects of extruded aquafeed on growth performance and gut microbiome of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Animal Feed Science and Technology*, 245, 91–103. doi:10.1016/j.anifeedsci.2018.09.002

- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. 2009. Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary Microbiology*, 135(3–4), 187–195. doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.025
- Burroughs, L., Clarke, P. A., Forintos, H., Gilks, J. A. R., Hayes, C. J., Vale, M. E., Wade, W., Zbytniewski, M. 2012. Asymmetric organocatalytic formation of protected and unprotected tetroses under potentially prebiotic conditions. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10(8), 1565–1570. doi:10.1039/c1ob06798b
- Cao, H., Yu, R., Zhang, Y., Hu, B., Jian, S., Wen, C. 2019. Effects of dietary supplementation with β -glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. *Pengze*). *Aquaculture*, 508(January), 106–112. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.04.064
- Carbone, D., Faggio, C. 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 172–178. doi:10.1016/j.fsi.2016.04.011
- Cavera, V. L., Arthur, T. D., Kashtanov, D., Chikindas, M. L. 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(5), 494–501. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011
- Christiaen, S., Brackman, G., Nelis, H. J., Coenye, T. 2011. Isolation and identification of quorum quenching bacteria from environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 87(2), 213–219. doi:10.1016/j.mimet.2011.08.002
- Cisneros-Mata, M. A., Montemayor-Lopez, G., Roman-Rodriguez, M. J. 1995. Life History and Conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Society for Conservation Biology*, 9(4), 806–814.
- CITES. 2019. Apendices I, II y III (26/11/19). In Convención sobre el comercio internacional de especies en peligro de extinción (Vol. 41).
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. 2018. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Mazatlán.
- Czajkowski, R., Jafra, S. 2009. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica*, 56(1), 1–16. doi:10.18388/abp.2009_2512
- Dawood, M. A. O., Koshio, S. 2016. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, 454, 243–251. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.12.033
- Denisse, S. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010: Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.
- Dong, Y., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J., Zhang, L. 2002. Identification of Quorum-Quenching N-Acyl

- Homoserine Lactonases from *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1754–1759. doi:10.1128/AEM.68.4.1754
- Eissa, N., Wang, H. P., Yao, H., Abou-ElGheit, E. 2018. Mixed *Bacillus* Species Enhance the Innate Immune Response and Stress Tolerance in Yellow Perch Subjected to Hypoxia and Air-Exposure Stress. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. doi:10.1038/s41598-018-25269-z
- Etyemez, M., Balcazar, J. L. 2016. Isolation and characterization of bacteria with antibacterial properties from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Research in Veterinary Science*, 105, 62–64. doi:10.1016/j.rvsc.2016.01.019
- FDA. 2020. GRAS Notices. Consultado June 15, 2020, from https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=D ESC&startrow=1&type=basic&search=Bacillus
- Foyosal, M. J., Chua, E. G., Gupta, S. K., Lamichhane, B., Tay, C. Y., Fotedar, R. 2020. *Bacillus mycoides* supplemented diet modulates the health status, gut microbiota and innate immune response of freshwater crayfish marron (*Cherax cainii*). *Animal Feed Science and Technology*, 262(August 2019), 114408. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114408
- Frischer, M. E., Floriani, P. J., Nierzwicki-Bauer, S. A. 1996. Differential sensitivity of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization is a result of ribosomal higher order structure. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(10), 1061–1071. doi:10.1139/m96-136
- Fuentes-Quesada, J. P., Viana, M. T., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Nomura-Solís, M., Gomez-Calle, V., Lazo, J. P., Mata-Sotres, J. A. 2018. Enteritis induction by soybean meal in *Totoaba macdonaldi* diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture*, 495(May), 78–89. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.05.025
- García-Triana, A. 2005. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN CULTIVO LARVARIO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE Antonio García Triana.
- García-Triana, A., Olmos-Soto, J. 2007. Quantification by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria associated with *Litopenaeus vannamei* larvae in Mexican shrimp hatchery. *Aquaculture*, 262(2–4), 211–218. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.10.039
- Gisbert, E., Castillo, M., Skalli, A., Andree, K. B., Badiola, I. 2013. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2766–2774. doi:10.2527/jas.2012-5414
- González-Félix, M. L., Gatlin, D. M., Urquidez-Bejarano, P., de la Reé-Rodríguez, C., Duarte-Rodríguez, L., Sánchez, F., Casas-Reyes, A., Yamamoto, F. Y., Ochoa-Leyva, A., Perez-Velazquez, M. 2018. Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 491(March), 239–251. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.03.031

- Hai, N. V. 2015. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917–935. doi:10.1111/jam.12886
- Hardy, R. W., Barrows, F. T. 2003. Diet Formulation and Manufacture. *Fish Nutrition*, 505–600. doi:10.1016/b978-012319652-1/50010-0
- Hernández-Zárate, G., Olmos-Soto, J. 2004. Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(6), 722–727. doi:10.1007/s00253-003-1451-z
- Hernández-Zárate, G., Olmos-Soto, J. 2006. Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 664–672. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02800.x
- Ibrahim, M. D. 2013. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. *Journal of Advanced Research*, 6(6), 765–791. doi:10.1016/j.jare.2013.12.004
- Jeon, H. L., Lee, N. K., Yang, S. J., Kim, W. S., Paik, H. D. 2017. Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 26(6), 1641–1648. doi:10.1007/s10068-017-0148-5
- Juarez, L. M., Konietzko, P. A., Schwartz, M. H. 2016. Totoaba Aquaculture and conservation: Hope for an endangered fish from Mexico's Sea of Cortez. *World Aquaculture*, 47(4), 30–38.
- Kennedy, M. B., Lennarz, W. J. 1979. Characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* and its relationship to a membrane-bound lipase found in a mutant strain. *Journal of Biological Chemistry*, 254(4), 1080–1089. doi:10.1016/s0021-9258(17)34170-4
- Krishnan, H. B., Jez, J. M. 2018. Review: The promise and limits for enhancing sulfur-containing amino acid content of soybean seed. *Plant Science*, 272(January), 14–21. doi:10.1016/j.plantsci.2018.03.030
- Krogdahl, Å., Gajardo, K., Kortner, T. M., Penn, M., Gu, M., Berge, G. M., Bakke, A. M. 2015. Soya Saponins Induce Enteritis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3887–3902. doi:10.1021/jf506242t
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., Lu, Y. 2019. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 87(November 2018), 820–828. doi:10.1016/j.fsi.2019.02.010
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., Lu, Y., Hlordzi, V., Sakyi, M. E., Afriyie, G., Wang, Z., Li, Y., Xie, C. X. 2019. Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*. doi:10.1007/s10695-019-00754-y
- Kuebutornye, F. K. A., Wang, Z., Lu, Y., Abarike, E. D., Sakyi, M. E., Li, Y., Xie, C. X., Hlordzi, V. 2019. Effects of three host-associated *Bacillus* species on mucosal immunity and gut health of Nile tilapia,

Oreochromis niloticus and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 97(October 2019), 83–95. doi:10.1016/j.fsi.2019.12.046

Kumar, R., Mukherjee, S. C., Prasad, K. P., Pal, A. K. 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research*, 37(12), 1215–1221. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01551.x

Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., Saksida, S. M. 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 471–496. doi:10.1146/annurev-marine-010814-015646

Langdon, A., Crook, N., Dantas, G. 2016. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Medicine*, 8(1). doi:10.1186/s13073-016-0294-z

Lesuisse, E., Schank, K., Colson, C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 216(1), 155–160. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18127.x

Liu, C. H., Wu, K., Chu, T. W., Wu, T. M. 2018. Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture International*, 26(1), 63–74. doi:10.1007/s10499-017-0189-z

López, L. M., Flores-Ibarra, M., Bañuelos-Vargas, I., Galaviz, M. A., True, C. D. 2015. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(4), 921–936. doi:10.1007/s10695-015-0058-5

López, L. M., Olmos-Soto, J., Trejo-Escamilla, I., Flores-Ibarra, M., Ochoa-Solano, J. L., Drawbridge, M., Peres, H. 2016. Evaluation of carbohydrate-to-lipid ratio in diets supplemented with *Bacillus subtilis* probiotic strain on growth performance, body composition and digestibility in juvenile white seabass (*Atractoscion nobilis*, Ayres 1860). *Aquaculture Research*, 47(6), 1864–1873. doi:10.1111/are.12644

López, L. M., Olmos-Soto, J., Trejo Escamilla, I., Flores Ibarra, M., Ochoa, L., Drawbridge, M., Peres, H. 2016. Evaluation of carbohydrate-to-lipid ratio in diets supplemented with *Bacillus subtilis* probiotic strain on growth performance, body composition and digestibility in juvenile white seabass (*Atractoscion nobilis*, Ayres 1860). *Aquaculture Research*, 47(6), 1864–1873. doi:10.1111/are.12644

Mata-Sotres, J. A., Lazo, J. P., Baron-Sevilla, B. 2015. Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture*, 437, 292–296. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.11.037

Mcgoogan, B. B., Gatlin, D. M. 1997. Effects of replacing fish meal with soybean meal in diets for red drum *Sciaenops ocellatus* and potential for palatability enhancement. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28(4), 374–385. doi:10.1111/j.1749-7345.1997.tb00284.x

McKillip, J. L. 2000. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a

- literature review. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 77(4), 393–399. doi:10.1023/A:1002706906154
- Meade, E., Slattery, M. A., Garvey, M. 2020. Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: Resistance is futile? *Antibiotics*, 9(1). doi:10.3390/antibiotics9010032
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., Maneerat, S. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8), 1337–1345. doi:10.1007/s11274-009-0020-8
- Ochoa-Solano, J. L., Olmos-Soto, J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23(6), 519–525. doi:10.1016/j.fm.2005.10.004
- Olmos-Soto, J. 2017. *Bacillus* Probiotic Enzymes: External Auxiliary Apparatus to Avoid Digestive Deficiencies, Water Pollution, Diseases, and Economic Problems in Marine Cultivated Animals. *Advances in Food and Nutrition Research*, 80, 15–35. doi:10.1016/bs.afnr.2016.11.001
- Olmos-Soto, J. 2021. Feed intake improvement, gut microbiota modulation and pathogens control by using *Bacillus* species in shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(2). doi:10.1007/s11274-020-02987-z
- Olmos-Soto, J., Acosta, M., Mendoza, G., Pitones, V. 2019. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of Microbiology*, (0123456789). doi:10.1007/s00203-019-01757-2
- Olmos-Soto, J., Ochoa-Solano, J. L., Paniagua-Michel, J., Contreras, R. 2011. Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* probiotic strains. *Marine Drugs*, 9(6), 1119–1132. doi:10.3390/md9061119
- Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J. 2014. *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 06(07), 361–365. doi:10.4172/1948-5948.1000169
- Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J. de J., Lopez, L., Ochoa, L. 2015. Functional Feeds. In *Springer handbook of marine biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin. pp. 1303–1319.
- Padilla-Sánchez, M. 2005. Caracterización de la Comunidad Bacteriana Presente en Cultivo de Camarón en Cultivo de Camarón *Litopenaeus vannamei*, U *Litopenaeus vannamei*, Utilizand tilizand tilizando Hibridación In Situ Fluorescente Hibridación In Situ Fluorescente Hibridación In Sit. doi:69310
- Pálffy, R., Gardlík, R., Behuliak, M., Kadasi, L., Turna, J., Celec, P. 2009. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. *Molecular Medicine*, 15(1–2), 51–59. doi:10.2119/molmed.2008.00087

- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., Jermakow, K. 2020. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1871–1881. doi:10.1007/s00253-020-10349-w
- Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K., Dobson, A., Cotter, P. D., Paul Ross, R., Hill, C., Schofs, L., Sparo, M. D., Sánchez Bruni, S. F., Productivity, I., Schaeffer, P., Millet, J., Aubert, J. P., Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., Lu, Y., Hlordzi, V., ... Garvey, M. 2020. Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: Resistance is futile? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9(1), 704–711. doi:10.1073/pnas.54.3.704
- Perry, W. B., Lindsay, E., Payne, C. J., Brodie, C., Kazlauskaitė, R. 2020. The role of the gut microbiome in sustainable teleost aquaculture. *Proceedings. Biological Sciences*, 287(1926), 20200184. doi:10.1098/rspb.2020.0184
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., Moon, T. W. 2012. Glucose metabolism in fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(8), 1015–1045. doi:10.1007/s00360-012-0658-7
- Preena, P. G., Swaminathan, T. R., Kumar, V. J. R., Singh, I. S. B. 2020. Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern. *Biologia*. doi:10.2478/s11756-020-00456-4
- Ray, A. K., Ghosh, K., Ringø, E. 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465–492. doi:10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x
- Reyes-Becerril, M., Alamillo, E., Sánchez-Torres, L., Ascencio-Valle, F., Perez-Urbiola, J. C., Angulo, C. 2016. Leukocyte susceptibility and immune response against *Vibrio parahaemolyticus* in *Totoaba macdonaldi*. *Developmental and Comparative Immunology*, 65, 258–267. doi:10.1016/j.dci.2016.07.016
- Rodriguez, M. J. R., Hammann, M. G. 1981. Age and growth of totoaba *Totoaba macdonaldi* (Scianidae), in the upper Gulf of California. *Fishery Bulletin*, 95(3), 620–628.
- Sang, Y., Blecha, F. 2008. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 9(2), 227–235. doi:10.1017/S1466252308001497
- Santos, R., Oliva-Teles, A., Saavedra, M., Enes, P., Serra, C. 2018. *Bacillus* spp. as source of Natural Antimicrobial Compounds to control aquaculture bacterial fish pathogens. *Frontiers in Marine Science*, 5(July), 10–12. doi:10.3389/conf.fmars.2018.06.00129
- Sharma, V., Ranveer, R. C., Jain, N., Aseri, G. K., Devi, S. M., Halami, P. M., Mohd Isa, M. H., Shamsudin, N. H., Al-Shorgani, N. K. N., Alsharjabi, F. A., Kalil, M. S., Ahern, M., Verschuere, S., Van Sinderen, D., Rasheed, H. A., Tuoheti, T., Zhang, Y. Y., Azi, F., ... Jafra, S. 2020. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *Lwt*, 27(1), 181–185. doi:10.1016/1357-2725(94)00071-I

- Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S. H., Kumar, V., Lybery, A. J., Roy, S., Ringø, E. 2019. Genus bacillus, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 27(3), 331–379. doi:10.1080/23308249.2019.1597010
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., Hahm, Y. T. 2015a. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2), 93–103. doi:10.1139/cjm-2014-0613
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., Hahm, Y. T. 2015b. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2), 93–103. doi:10.1139/cjm-2014-0613
- Tacon, A. G. J. 1989. *Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados*. Manual de capacitacion. from <http://www.fao.org/3/ab492s/AB492S00.htm#TOC>
- Tacon, A. G. J., Metian, M. 2015. Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 23(1), 1–10. doi:10.1080/23308249.2014.987209
- Tal, Y., Schreier, H. J., Sowers, K. R., Stubblefield, J. D., Place, A. R., Zohar, Y. 2009. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. *Aquaculture*, 286(1–2), 28–35. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.043
- Tang, K., Zhang, Y., Yu, M., Shi, X., Coenye, T., Bossier, P., Zhang, X. H. 2013. Evaluation of a new high-throughput method for identifying quorum quenching bacteria. *Scientific Reports*, 3, 1–9. doi:10.1038/srep02935
- Teles, A. O., Couto, A., Enes, P., Peres, H. 2020. Dietary protein requirements of fish – a meta-analysis. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1445–1477. doi:10.1111/raq.12391
- Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M. A., Flores-Ibarra, M., Álvarez González, C. A., López, L. M. 2017a. Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. *Aquaculture Research*, 48(8), 4038–4057. doi:10.1111/are.13225
- Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M. A., Flores-Ibarra, M., Álvarez González, C. A., López, L. M. 2017b. Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. *Aquaculture Research*, 48(8), 4038–4057. doi:10.1111/are.13225
- True, C. 2012. *Desarrollo de la biotecnia de cultivo de Totoaba macdonaldi*. (Universidad Autónoma de Baja California). from http://fcm.ens.uabc.mx/jatay/tesis/posgrado/oceanografia_costera/doctorado/Desarrollo de la biotecnia de cultivo de Totoaba.pdf
- Truong Thy, H. T., Tri, N. N., Quy, O. M., Fotedar, R., Kannika, K., Unajak, S., Areechon, N. 2017. Effects of

the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 60, 391–399. doi:10.1016/j.fsi.2016.11.016

- Turnbull, P. C., Kramer, J., Melling, J. 1991. *Bacillus*. Manual of clinical microbiology (5th ed.).
- Uran, P. A., Schrama, J. W., Rombout, J. H. W. M., Obach, A., Jensen, L., Koppe, W., Verreth, J. A. J. 2008. Soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at different temperatures. *Aquaculture Nutrition*, 14(4), 324–330. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00534.x
- Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Ángeles Esteban, M., Dadar, M., Dawood, M. A. O., Faggio, C. 2020. Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 28(1), 16–42. doi:10.1080/23308249.2019.1643288
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(2), 83–87. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01255.x
- Wang, H., Fewer, D. P., Holm, L., Rouhiainen, L., Sivonen, K. 2014. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), 9259–9264. doi:10.1073/pnas.1401734111
- Wu, S., Ren, Y., Peng, C., Hao, Y., Xiong, F., Wang, G., Li, W., Zou, H., Angert, E. R. 2015. Metatranscriptomic discovery of plant biomass-degrading capacity from grass carp intestinal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(10), 1–9. doi:10.1093/femsec/fiv107
- Yanbo, W., Zirong, X. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127(3–4), 283–292. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003
- Yang, G., Cao, H., Jiang, W., Hu, B., Jian, S., Wen, C., Kajbaf, K., Kumar, V., Tao, Z., Peng, M. 2019. Dietary supplementation of *Bacillus cereus* as probiotics in Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze): Effects on growth performance, fillet quality, serum biochemical parameters and intestinal histology. *Aquaculture Research*, 50(8), 2207–2217. doi:10.1111/are.14102
- Yi, Y., Zhang, Z., Zhao, F., Liu, H., Yu, L., Zha, J., Wang, G. 2018. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 78, 322–330. doi:10.1016/j.fsi.2018.04.055
- Zhao, X., Kuipers, O. P. 2016. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics*, 17(1), 1–18. doi:10.1186/s12864-016-3224-y
- Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J., Huang, G. 2018. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117(2017), 781–

789. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.233