

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

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



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

**Aplicación de alimentos funcionales adicionados con
probióticos del género *Bacillus* en el cultivo de tilapia del Nilo
(*Oreochromis niloticus*) para la optimización de respuesta
frente a infecciones bacterianas.**

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

Presenta:

Leslye Leticia Macías Pedraza

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Leslye Leticia Macías Pedraza

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Olmos Soto
Director de tesis

M.C Manuel de Jesús Acosta Ruiz

Dr. Jaime Farber Lorda



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Leslye Leticia Macías Pedraza** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Aplicación de alimentos funcionales adicionados con probióticos del género *Bacillus* en el cultivo de Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) para la optimización de respuesta frente a infecciones bacterianas.

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Olmos Soto
Director de tesis

Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es por mucho, la especie más cultivada de su género a nivel mundial, representando del 70% al 80% total de la producción. Debido a su alta demanda en el mercado, estos peces son cultivados en sistemas intensivos, haciéndolos más susceptibles a enfermedades, incrementando su tasa de mortalidad y ocasionando pérdidas económicas severas en el sector acuícola. Bacterias patógenas oportunistas como las especies del género *Aeromonas* son las principales responsables de las pérdidas en los cultivos, ocasionando daños severos en la mucosa intestinal, reducción de la capacidad de absorción de nutrientes en el tracto digestivo de los peces y septicemia. Esta investigación tiene como objetivo, el desarrollo de una dieta funcional suplementada con especies del género *Bacillus*, capaces de prevenir la proliferación de patógenos oportunistas como *Aeromonas hydrophila*, mejorar el crecimiento y supervivencia de los peces cultivados.

Palabras clave: Tilapia del Nilo, *Aeromonas hydrophila*, dieta funcional, *Bacillus* spp.

Abstract of the thesis presented by **Leslye Leticia Macías Pedraza** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Ciencias de la Vida with orientation in Marine Biotechnology.

Application of functional foods added with probiotics of *Bacillus* gender in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture for the optimization of response against bacterial infections.

Abstract approved by:

PhD. Jorge Olmos Soto
Thesis Director

Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most cultured specie of its gender around the world, representing between 70% to 80% of total production. Because of the high demand, this species is cultured in intensive systems, causing them to be more susceptible to diseases, increasing mortality rate, and leading to several losses in the aquaculture sector. Opportunistic pathogens *Aeromonas*, are the first responsible for disease outbreaks causing severe damage in intestinal mucous, reducing nutrient absorption in the intestines of fishes, and septicemia. This study aims to develop a functional diet added with *Bacillus* species, which can prevent pathogens infections like *Aeromonas hydrophila*, besides improving and survival of cultured fish.

Keywords: Nile Tilapia, *Aeromonas hydrophila*, functional diet, *Bacillus* spp.

Dedicatoria

A mi madre por ser el impulso necesario en los momentos que no encuentro la salida.

A mi padre por demostrarme que no importa donde me encuentre, siempre va a encontrar la manera de llegar a mí.

A mi hermano por ser un maestro, confidente y amigo.

A mis versiones pasadas por arriesgarse y atreverse a soñar en alto.

Agradecimientos

Agradezco a la institución CICESE por abrirme las puertas para estudiar aquí, estoy muy orgullosa de decir que estudié en este lugar y por los años que restan llevaré el nombre en alto. A CONAHCYT por ser clave fundamental en el proyecto y manutención personal.

A mi asesor, Dr. Jorge Olmos Soto, por compartir conmigo sus conocimientos y hacerme crecer como investigadora, agradeceré siempre la oportunidad que me dio y confiar en mí para el proyecto.

A los miembros de mi comité M.C. Manuel de Jesús Acosta y Dr. Jaime Farber Lorda, por aceptar ser parte del proyecto, sus análisis críticos, consejos y atenciones.

A la M.C. Rosalía Contreras por sus conocimientos compartidos, asesoramiento en el laboratorio y sus consejos brindados desde el corazón.

A Víctor Mercado y Jonathan, por ser parte fundamental para el proyecto, les estaré eternamente agradecida.

A mi familia por dejarme volar fuera de casa y apoyarme en esta decisión a pesar de lo difícil que fue cada despedida y cada abrazo antes de subir al avión.

A mis amigas y amigos que conocí en esta ciudad, gracias por hacerme sentir apoyada, contenida, querida y enseñarme que hay familias que elegimos formar.

A mi hermana adoptiva peruana, siempre tendrás un lugar en mi mesa.

A mis mejores amigos que vinieron a visitarme, gracias por demostrarme que las distancias no importan y los abrazos las acortan. Fueron un respiro en momentos de caos y luces que iluminaron mi camino.

A mis amigos del cubículo, gracias por el apoyo, los cafés y risas compartidas.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Generalidad de Tilapia del Nilo.....	2
1.1.2 Generalidades de <i>Aeromonas</i> spp.....	3
1.1.3 Patogénesis de <i>Aeromonas hydrophila</i> en la especie Tilapia del Nilo.....	3
1.1.4 Uso de probióticos en la acuicultura.....	4
1.1.5 Generalidades género <i>Bacillus</i>	5
1.1.6 Mecanismos de acción de <i>Bacillus</i> contra microorganismos patógenos.....	5
1.1.6.1 Péptidos antimicrobianos (AMP's).....	5
1.1.6.2 Quorum quenching (QQ).....	6
1.1.6.3 Enzimas líticas.....	6
1.1.6.4 Producción de antibióticos.....	7
1.1.6.5 Competencia por sitios de adhesión y nutrientes.....	7
1.1.6.6 Producción de ácidos orgánicos.....	7
1.1.6.7 Estimulación del sistema inmune del huésped.....	7
1.1.7 <i>Bacillus</i> : productor de enzimas digestivas y su relación en prevenir infecciones.....	8
1.2 Justificación.....	8
1.3 Hipótesis.....	9

1.4	Objetivos	9
1.4.1	Objetivo general	9
1.4.2	Objetivos específicos.....	9
Capítulo 2.	Metodología.....	10
2.1	Obtención del patógeno <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675.	10
2.1.1	Cinética de crecimiento de <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675.	10
2.1.2	Caracterización de los productos extracelulares (EPC) de <i>A. hydrophila</i> CAIM675.....	10
2.1.2.1	Ensayos de actividad hemolítica.	11
2.1.2.2	Ensayos de actividad proteolítica.....	11
2.1.2.3	Ensayos de actividad lipolítica.....	11
2.1.3	Dosis Letal 50 en Tilapia del Nilo.....	11
2.2	Selección de cepas de <i>Bacillus</i>	12
2.2.1	Actividad antimicrobiana	12
2.2.2	Cinética de crecimiento de las cepas con potencial probiótico.....	12
2.2.3	Ensayos de actividad enzimática	13
2.2.4	Ensayo de resistencia a antibióticos.....	13
2.3	Diseño experimental del cultivo de Tilapia del Nilo.....	14
2.3.1	Preparación de las dietas probióticas.	14
2.3.2	Periodo de aclimatación y diseño del cultivo de Tilapia del Nilo.....	14
2.3.3	Desempeño del crecimiento de Tilapia del Nilo.....	15
2.3.4	Challenge con <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675.....	16
2.4	Análisis estadístico.	16
Capítulo 3.	Resultados	17
3.1	Caracterización de <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675.	17
3.1.1	Cinética de crecimiento de <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675.	17

3.1.2	Caracterización de los EPC de <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675	17
3.1.2.1	Ensayo de actividad hemolítica.....	18
3.1.2.2	Ensayo de actividad proteolítica.....	19
3.1.3	Dosis Letal 50 en Tilapia del Nilo.....	19
3.2	Selección de cepas de <i>Bacillus</i> con potencial probiótico	20
3.2.1	Actividad antimicrobiana	20
3.2.2	Cinética de crecimiento de las cepas con potencial probiótico.....	21
3.2.3	Ensayos de actividad enzimática.....	22
3.2.4	Ensayo de resistencia a antibióticos.....	23
3.3	Bioensayo de alimentación en Tilapia del Nilo	24
3.3.1	Desempeño de Tilapia del Nilo.....	24
3.4	Desafío contra <i>A. hydrophila</i> CAIM675 en cultivo de Tilapia del Nilo	25
Capítulo 4. Discusión		26
Capítulo 5. Conclusiones		31
Literatura citada		32
Anexos		44

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Curva de crecimiento de <i>A. hydrophila</i> CAIM675 en Medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI) y Medio Luria-Bertani (LB). La bacteria fue crecida a 30°C, durante 12 horas a 200 rpm.....	17
Figura 2. Obtención de EPC de <i>A. hydrophila</i> en Medio BHI. Los puntos marcados en la curva representan los distintos tiempos en los que se tomaron las muestras. La bacteria fue crecida a 30°C, durante 12 horas a 200 rpm.	17
Figura 3. Actividad hemolítica de los EPC obtenidos en los diferentes tiempos de la curva en placas de Agar Sangre.	18
Figura 4. Actividad proteolítica de los EPC de <i>A. hydrophila</i> CAIM675 obtenidos en los diferentes tiempos de la curva en placas de Agar Skim-Milk (SM).	19
Figura 5. Fotografías de Tilapias infectadas con <i>A. hydrophila</i> CAIM675 vía intraperitoneal. Los peces inyectados mostraron los signos externos característicos de la infección: hemorragias, exoftalmia, úlceras, oscurecimientos de la dermis e inflamación de la zona ventral.....	20
Figura 6. Ensayos de actividad antimicrobiana contra <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675. Cepas de <i>Bacillus</i> : a) <i>Bacillus velezensis</i> (P3), b) <i>Bacillus subtilis</i> (B2) y c) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (K23) vs <i>A. hydrophila</i> CAIM675.	20
Figura 7. Curva representativa de crecimiento de la cepa B2 (<i>Bacillus subtilis</i>).....	21
Figura 8. Crecimiento de las cepas de <i>Bacillus</i> en distintos medios de cultivo.	22
Figura 9. Actividad enzimática de las cepas de <i>Bacillus</i> en diferentes medios de cultivo.	23
Figura 10. Desempeño de Tilapia del Nilo. 1 Los valores corresponden a la media±SE por triplicado. 2 Los valores con (*) son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). Parámetros: a) PG, b) TEC, c) CTC, d) IPI.	24
Figura 11. Porcentaje de mortalidad acumulada de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentada con las distintas dietas experimentales y la dieta control después de 15 días de la infección con <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675. Control: dieta sin probiótico. P3: Dieta control + <i>Bacillus velezensis</i> . B2: Dieta control + <i>Bacillus subtilis</i> . K23: Dieta control + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , 2×10^6 CFU/g en la dieta respectivamente.	25
Figura 12. Comparación de la mortalidad acumulada (%) en Tilapia del Nilo alimentada con la dieta B2 después de la infección por <i>Aeromonas hydrophila</i> , respecto a investigaciones previas.....	44
Figura 13. Comparación del peso ganado(g) en la especie Tilapia del Nilo alimentada con dieta control (DC) y dieta experimental (DE) B2 respecto a otras investigaciones.	45

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Principales genes de virulencia asociados en la patogénesis de <i>A. hydrophila</i> en peces	4
Tabla 2. Clasificación de las bacteriocinas producidas por las especies de <i>Bacillus</i> Extraído de (Mercado y Olmos, 2022)	6
Tabla 3. Información nutricional de las dietas experimentales.	14
Tabla 4. Actividad hemolítica de <i>A. hydrophila</i> CAIM675	18
Tabla 5. Actividad proteolítica de <i>A. hydrophila</i> CAIM675	19
Tabla 6. Actividad antimicrobiana de probióticos P3, B2 y K23	21
Tabla 7. Ensayos de actividad enzimática de las cepas de <i>Bacillus</i> con potencial probiótico.	22
Tabla 8. Ensayos de resistencia a antibióticos.	23
Tabla 9. Parámetros de crecimiento de <i>O. niloticus</i> después de 40 días de consumo con la dieta control y las dietas añadidas con las diferentes cepas probióticas del género <i>Bacillus</i>	24
Tabla 11. Comparativa de la composición proximal de la dieta basal de Tilapia del Nilo.	46
Tabla 12. Comparación de la cantidad (%) de los ingredientes proteicos en la dieta basal de Tilapia.	46

Capítulo 1. Introducción

Los alimentos de origen marino son una excelente fuente de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales y micronutrientes esenciales (Mathiesen, 2015). Actualmente, la acuicultura contribuye con el 46,8% de la producción total de alimentos de origen marino a nivel mundial (Bharathi et al., 2019). De acuerdo con los datos del 2020 reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Cai et al., 2019), la producción acuícola mundial creció en promedio un 5.3% anual en el periodo del 2001 al 2018. En el 2018, la producción acuícola mundial de pescado alcanzó las 82.1 millones de toneladas, siendo Tilapia la segunda especie piscícola más importante después de las carpas, alcanzando 7 millones de toneladas producidas. México ocupa la cuarta posición de producción pesquera en Latinoamérica y el Caribe, alcanzando un total de 247 000 toneladas en el 2018; siendo *Litopenaeus vannamei* y *Oreochromis niloticus* las dos especies más importantes, representando el 64% y 21 % de la producción total, respectivamente. El éxito de la producción de tilapia es debido a su rápido crecimiento y tolerancia a diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, la alta demanda en el mercado ha desencadenado la utilización de sistemas de cultivo intensivos con condiciones cada vez más estresantes para los peces, provocando que sean más susceptibles a agentes patógenos, incrementando su tasa de mortalidad y reduciendo la producción total del sector acuícola (El-Sayed, 2020b; Faruk y Anka, 2017; Huicab et al., 2016; Kayansamruaj et al., 2014).

Las tilapias son susceptibles a enfermedades bacterianas, parasitarias, víricas y fúngicas, siendo las infecciones bacterianas las principales amenazas en las granjas de cultivo intensivo (El-Sayed, 2020b; Kayansamruaj et al., 2014). Las enfermedades bacterianas más importantes reportadas a nivel mundial en el cultivo de Tilapia son: Streptococcosis, Aeromonas Septicemia, Vibriosis, Staphylococcosis, Pseudomonas, Francisellosis, Columnaris, Edwardsiellosis, Mycobacteriosis, entre otras (El-Sayed, 2020b; Kayansamruaj et al., 2020; Rodger, 2016; Romana et al., 2020). Diversos antibióticos y sustancias químicas son el método clásico para combatir las infecciones microbianas, sin embargo, el uso intensivo de los mismos tiene consecuencias nocivas como la acumulación en el hábitat acuático, desarrollo y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos, bioacumulación en tejidos y alteraciones en la microbiota de los peces y mamíferos (Azevedo et al., 2015; Muñoz et al., 2013). Como alternativa al uso de antibióticos, los alimentos funcionales han emergido como maneras más sostenibles de mejorar la salud y el rendimiento de los cultivos, induciendo beneficios fisiológicos en el huésped más allá de los que brindan los alimentos tradicionales; al promover el crecimiento, mejorar el sistema inmunológico, incrementar la actividad

enzimática digestiva, la absorción de nutrientes y mejorar la calidad de agua en los sistemas de cultivo (Bharathi et al., 2019; Hoseinifar et al., 2016; Olmos Soto et al., 2015).

Por esta razón, se propone la formulación de un alimento funcional adicionado con bacterias probióticas del género *Bacillus*, capaces de producir sustancias antimicrobianas y enzimas digestivas que le brindarán beneficios protectores y digestivos al cultivo de Tilapia del Nilo, además de ser reconocidas como seguras por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para su utilización en alimentos de consumo humano (Abriouel et al., 2011; Guo et al., 2009; Olmos et al., 2020; Olmos Soto, 2021).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidad de Tilapia del Nilo.

El término tilapia es el nombre común para los 3 géneros de la familia Cichlidae: *Oreochromis*, *Sarotherodon* y Tilapia, son peces de agua dulce, nativos de África y el Medio Oriente. Han sido introducidos en regiones tropicales, subtropicales y templadas alrededor del mundo con fines acuícolas, principalmente (El-Sayed, 2020a). En el continente americano, las especies de tilapia más importantes cultivadas son: Tilapia del Nilo (*O. niloticus*), Tilapia Mozambique (*O. mossambicus*), Tilapia azul (*O. aureus* y *Oreochromis urolepis hornorum*) (Fitzsimmons, 2000; Watanabe et al., 2002). Tilapia del Nilo es la especie más cultivada de su género a nivel mundial, caracterizada por ser más resistente a altas temperaturas, salinidad, hipoxia y altos niveles de amoníaco en el agua de cultivo que otras especies de agua dulce (FAO, 2023; Vajargah, 2021). Según reportes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el 2018, Tilapia del Nilo representó del 70% al 80% total de la producción de tilapias durante el periodo 2000-2016, dicha alta demanda ha provocado el uso de sistemas de cultivo intensivos donde los peces están sujetos a condiciones estresantes, provocándoles diversas enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos (Harper y Wolf, 2009; Ibrahim, 2019). Autores como (El-Sayed, 2006; Kayansamruaj et al., 2014) mencionan que las principales enfermedades que amenazan los sistemas de cultivo intensivos de tilapia son causadas por bacterias, siendo las más comunes *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Francisella* spp., *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus iniae* (Huicab et al., 2016).

1.1.2 Generalidades de *Aeromonas* spp.

El género *Aeromonas* se divide en 2 grupos: psicrófilas, bacterias inmóviles con un crecimiento óptimo entre los 22 a 25°C; y mesófilas, bacterias móviles con crecimiento óptimo entre los 35 a 37°C (Liu, 2015; Parker y Shaw, 2011). Ambos grupos son capaces de ocasionar enfermedades en los peces, por ejemplo la especie psicrófila *A.salmonicida* es causante de la furunculosis, enfermedad que afecta principalmente a los salmónidos. Mientras que las especies mesófilas *A. hydrophila* y *A. veronii*, son causantes de diferentes afecciones como septicemia hemorrágica y la enfermedad de las llagas rojas (Dallaire et al., 2014; Jiravanichpaisal et al., 2009).

1.1.3 Patogénesis de *Aeromonas hydrophila* en la especie Tilapia del Nilo.

Aeromonas hydrophila es responsable de diversos brotes epidémicos en cultivos de peces, principalmente en países como China, Egipto y EUA, ocasionando la pérdida de millones de dólares en el sector acuícola a nivel mundial (Aboyadak et al., 2017; Da Silva et al., 2012; Hossain et al., 2013; Rasmussen et al., 2016; Yang et al., 2016) . *A.hydrophila* es causante de septicemia por *Aeromonas* móviles (SAM), una de las principales enfermedades en el cultivo de tilapia. La bacteria entra al cuerpo del pez a través de lesiones cutáneas o branquiales, provocando inflamación intestinal, reduciendo la capacidad de absorción de nutrientes de su tracto digestivo y dañando severamente su mucosa intestinal (El-Bahar et al., 2019; Hossain et al., 2013; Kong et al., 2017; Lafferty et al., 2015; Peatman et al., 2018). El periodo de incubación varía entre 2 a 4 días por infecciones naturales y de 8 a 48 horas en modelos experimentales, dependiendo de distintos factores como la especie del pez, resistencia al patógeno, condiciones ambientales y la temporada de cultivo (Bach et al., 1978; Huizinga et al., 1979). Los peces enfermos presentan signos como exoftalmia, enrojecimiento de la piel, acumulación de líquido en las bolsas de las escamas, abdomen distendido, úlceras en la dermis y estallido de las órbitas, lo que conlleva a una ceguera y posteriormente a la muerte. Sin embargo, en fases agudas de la enfermedad se puede desarrollar una septicemia tan rápida que el pez muere antes de presentar signos evidentes (Dahdouh et al., 2016; Elkemary et al., 2019; Faktorovich, 1969). Yambot y Inglis (1994) reportaron que los signos más comunes de MAS en la fase de mortalidad aguda en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) son: opacidad en uno o ambos ojos, exoftalmia y posteriormente estallido de la órbita. La patogenicidad de *Aeromonas hydrophila* en los peces es multifactorial, posee diversos factores de virulencia y sustancias tóxicas capaces de actuar de manera individual o en conjunto y dañar de manera directa o indirecta las células de los peces (Beaz y Figueras, 2013; Pemberton et al., 1997).

Las toxinas aerolisina, enterotoxina citotónica y citotóxica son causantes de daño celular (Dong et al., 2018), las hemolisinas (α y β) ocasionan efectos citotóxicos y lisis en los eritrocitos (Pemberton et al., 1997; Singh y Sanyal, 1992). Así mismo, las lipasas promueven el daño epitelial en el tracto digestivo de los peces (Chacón et al., 2002; Ellis, 1991; Figueras, 2011) y las proteasas dañan el tejido del hospedero directamente o mediante la activación de enzimas proteolíticas (Kirov, 1997; Leung y Stevenson, 1988; Shieh, 1987).

Tabla 1. Principales genes de virulencia asociados en la patogénesis de *A. hydrophila* en peces

Gen	Función	Literatura consultada
Toxinas		
Act	Actividad enterotóxica, hemolítica y citotóxica. Degeneración del intestino delgado: Causa daño del tejido y es responsable de la secreción de fluido en los enterocitos.	(Rasmussen et al., 2016; Sha et al., 2002)
Alt	(Enterotoxina termolábil 56°C). Contribución a la secreción de fluidos en los enterocitos.	(Rasmussen et al., 2016; Sha et al., 2002)
Ast	(Enterotoxina termoestable 56°C). Contribución a la secreción de fluidos en los enterocitos.	(Rasmussen et al., 2016; Sha et al., 2002)
aerA	(Aerolisina) Actividad hemolítica, citotóxica y enterotóxica. Se une a las membranas de las células blanco y genera poros celulares.	(Tomás, 2012).
Hemolisinas		
hylA	Provoca lisis completa de eritrocitos induciendo anemia.	(El-Bahar et al., 2019; Xia et al., 2004)
Proteasas		
ahpB	(Elastasa metaloproteasa). Asociada con la capacidad bacteriana de adherirse e invadir la mucosa intestinal Implicada en la aparición de úlceras en la dermis y hemorragias en tejido muscular de peces	(Arnadottir et al., 2009; Sen y Rodgers, 2004).
serA	(Serina Proteasa). Facilita la invasión en el huésped mediante la activación de toxinas o causando daño directo en tejido. Relacionado con la activación de GCAT y aerolisina.	(Eggset et al., 1994; Feng et al., 2022)

1.1.4 Uso de probióticos en la acuicultura

El uso de antibióticos y productos químicos es utilizado como estrategia antimicrobiana tradicional para el control de enfermedades en los cultivos de peces. Sin embargo, existe un riesgo asociado con el desarrollo, propagación y transmisión de patógenos resistentes a dichos agentes antimicrobianos. Los alimentos funcionales adicionados con probióticos han emergido como alternativa al uso de antibióticos, debido a que cuando se administran en cierta concentración influyen favorablemente en la salud del huésped mediante la modificación de la microbiota intestinal, la secreción de sustancias antibacterianas (bacteriocinas y ácidos orgánicos), la competencia por nutrientes contra microorganismos patógenos y evitar su adhesión al tracto digestivo del huésped (Hoseinifar et al., 2016; Luis et al., 2011; Olmos y Paniagua Michel, 2014).

1.1.5 Generalidades género *Bacillus*

El género *Bacillus* está conformado por un diverso grupo de bacterias con forma bastonada, gram-positivos, productores de esporas y con capacidad de crecer eficientemente en fuentes de carbono y nitrógeno de bajo costo (Hoch y Losick, 1993; Ochoa y Olmos, 2006; Olmos et al., 2011). El género comprende alrededor de 200 especies que pueden encontrarse en ambientes muy diversos y con la capacidad de sobrevivir a niveles extremos de pH, temperatura y salinidad (Annamalai et al., 2013; Ichimatsu et al., 2000; Motta et al., 2004; Ray et al., 2012; Sturr et al., 1994; Yang et al., 2013). Existen una gran variedad de estudios que han utilizado bacterias del género *Bacillus* como probióticos en las dietas de diversas especies acuícolas, generando beneficios como el incremento del peso y eficiencia alimenticia en *L. vannamei* y *Epinephelus coioides* (Liu et al., 2012; Olmos et al., 2011) protección contra patógenos en la carpa común (*Cyprinus carpio*) (Gupta et al., 2014) y mejora en la calidad de agua en los tanques de cultivo de *L. vannamei* (Cai et al., 2019). Diversos autores han reportado los beneficios obtenidos con diversas especies de *Bacillus* spp. en Tilapia del Nilo, como aumento en el crecimiento y digestibilidad (Aly et al., 2008; Telli et al., 2014), incremento de la respuesta inmunológica contra patógenos (Gupta et al., 2014; Liu et al., 2017; Zhou et al., 2010) y mejora en la morfología intestinal (Reda y Selim, 2015).

1.1.6 Mecanismos de acción de *Bacillus* contra microorganismos patógenos.

Existen diversos mecanismos por los cuáles las especies del género *Bacillus* al ser añadidas en la dieta, son capaces de combatir organismos patógenos: producción de factores antimicrobianos (bacteriocinas, ácidos orgánicos, antibióticos), quorum quenching (QQ), enzimas líticas, competencia por nutrientes, receptores y sitios de adhesión y la estimulación del sistema inmune del huésped (Chauhan y Singh, 2019; Kuebutornye et al., 2020a; Kuebutornye et al., 2020b; Soltani et al., 2019).

1.1.6.1 Péptidos antimicrobianos (AMP's).

Diversas especies del género *Bacillus* son productoras de péptidos antimicrobianos (AMP's), también llamadas bacteriocinas. Son moléculas pequeñas, anfipáticas y usualmente catiónicas, que presentan actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas, mediante interacciones específicas (unión a receptores) o inespecíficas a las membranas de las células target (Kuebutornye et al., 2020a; Mercado y

Olmos, 2022). Existen diversas clases de bacteriocinas y están clasificadas según su tamaño y características:

Tabla 2. Clasificación de las bacteriocinas producidas por las especies de *Bacillus* Extraído de (Mercado y Olmos, 2022)

Clasificación	Características	Subclasificación
Clase I	Tamaño pequeño (≤ 5 kDa), péptidos policíclicos, en su mayoría catiónicos, con modificaciones postraduccionales. Contienen anillos de lantionina o metilantionina.	Clase I.1: Péptido único, lantibioticos elongados. Clase I.2: Péptido único, globular y otras estructuras lantibióticas. Class I.3: Lantibióticos de 2 componentes. Class I.4: Péptidos cíclicos.
Clase II	Tamaño pequeño (0.77-10 kDa), péptidos sin modificación postraduccionaI.	Clase II.1 Péptidos como pediocina. Class II.2 Péptidos como turicina. Class II.3 Otros péptidos lineales no modificados.
Clase III	Tamaño grande (≥ 30 kDa), proteínas termolábiles.	Complejos proteicos grandes con actividad de fosfolipasa.

1.1.6.2 Quorum quenching (QQ)

El Quorum sensing (QS), es un mecanismo de regulación bacteriano dependiente de la densidad celular mediante el cual las bacterias coordinan su expresión genética a través de la producción, liberación y reconocimiento de moléculas autoinductoras, cómo N-acil homoserina lactona (AHL). La interrupción del (QS), mediante la producción de enzimas que degradan AHL y por consecuente inhiben el crecimiento del patógeno es llamado Quorum quenching (QQ). Algunos autores han reportado el uso de este mecanismo en algunas especies de *Bacillus* como una manera para combatir patógenos (Defoirdt et al., 2004; Kuebutornye et al., 2020a; Zhang y Dong, 2004).

1.1.6.3 Enzimas líticas

La secreción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, proteasas, celulasas y β -1,3-glucanasas es otro mecanismo por el cuál diversas especies del género *Bacillus* presentan actividad antibacteriana y antifúngica, al jugar un papel importante en la degradación de la pared celular de microorganismos patógenos (Biziulevièius y Pukaitè, 2002; Kuebutornye et al., 2020a; So-Young et al., 1999; Urdaci y Pinchuk, 2004).

1.1.6.4 Producción de antibióticos

Algunas especies del género *Bacillus*, son secretoras de diversos antibióticos de clase peptídica, lipopeptídica, aminoglicósida y otras estructuras químicas. Exhiben una actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas (bacitricina, laterosporina, gramidicina) y gram-negativas (polymixina), antifúngica (micobacilina) y antiviral (surfactina, subtilina, erinicina) (Kajimura y Kaneda, 1996; Kuebutornye et al., 2020a; Pinchuk et al., 2001; Sato et al., 1992; Suva et al., 2016).

1.1.6.5 Competencia por sitios de adhesión y nutrientes.

Existe evidencia de que las bacterias con capacidad probiótica pueden desplazar a los microorganismos patógenos del tracto digestivo del huésped y evitar que continúen con su infección, al competir por fuentes de energía y sitios de adhesión en común (Addo et al., 2017; Hassanein y Soliman, 2010; Kuebutornye et al., 2020a; Ringo et al., 2007; Verschuere et al., 2000).

1.1.6.6 Producción de ácidos orgánicos.

Las bacterias ácido-lácticas (LAB) son productoras de ácidos orgánicos con efectos antimicrobianos, actúan reduciendo el pH ocasionando la acidificación del citoplasma celular y la formación de ácidos no disociados. Estos ácidos son capaces de atravesar la membrana de manera pasiva, alterar su permeabilidad y los sistemas de transporte de sustratos (Ammor et al., 2006; Kashket, 1987; Podolak et al., 1996; Snijders et al., 1985).

1.1.6.7 Estimulación del sistema inmune del huésped

Diversos autores reportan la capacidad de algunas cepas probióticas de *Bacillus* de modular el sistema inmune innato y celular de los peces, al incrementar la actividad lisosómica, fagocítica y la secreción de citocinas antiinflamatorias (Gómez y Balcázar, 2008; Kim y Austin, 2006; Panigrahi et al., 2004; Pirarat et al., 2006).

1.1.7 *Bacillus*: productor de enzimas digestivas y su relación en prevenir infecciones.

El tracto digestivo tiene una gran influencia en la salud y el desarrollo de los peces, la acumulación de alimentos no consumidos y efluentes generados debido a la incorrecta digestión y asimilación de las dietas, proveen el escenario perfecto para el desarrollo de enfermedades bacterianas en sistemas de cultivo intensivos. Las especies del género *Bacillus* son excelentes productores de enzimas digestivas que al ser añadidas en las dietas de los peces les otorga la capacidad de digerir y utilizar los nutrientes de la misma, mejorando su rendimiento, tasa de supervivencia, morfología intestinal, reducción en la acumulación de residuos y contaminación en los cultivos (Bairagi et al., 2002; Luo et al., 2020; Xu et al., 2017).

1.2 Justificación

Debido a la alta demanda en los alimentos marinos, las zonas de pesca han alcanzado su máximo potencial, propiciando un crecimiento exponencial en la industria de la acuicultura y dando lugar a una sobreexplotación en los sistemas de cultivo. Dicha sobreexplotación causa altos niveles de estrés en los peces, haciéndolos más susceptibles a infecciones por patógenos oportunistas como son las bacterias del género *Aeromonas*, causantes de diversas enfermedades en peces de alto valor comercial como lo es la especie Tilapia del Nilo. Para remediarlo, los acuicultores utilizan antibióticos y productos químicos, que han traído como consecuencia la generación de patógenos resistentes a dichas sustancias, causando peligros ambientales y problemas de seguridad alimentaria. En este sentido, la generación de alimentos funcionales adicionados con bacterias probióticas del género *Bacillus* son una nueva alternativa para controlar la proliferación de patógenos y prevenir el desarrollo de enfermedades en los peces cultivados. En México, no existen investigaciones que reporten el uso de esta bacteria probiótica en la prevención de infecciones contra bacterias patógenas oportunistas como lo es *Aeromonas hydrophila*, es por ello, que en esta investigación se busca generar un alimento funcional adicionado con probióticos capaces de prevenir dicha infección, lo que traería a los acuicultores una solución a las pérdidas masivas de cultivo, principalmente de Tilapia del Nilo, además de reducir el uso de antibióticos y las repercusiones al medio ambiente.

1.3 Hipótesis

La aplicación de una dieta funcional adicionada con bacterias del género *Bacillus* con capacidad probiótica en el cultivo de Tilapia del Nilo, le brindará efectos protectores frente a la infección causada por *Aeromonas hydrophila*, mejorará sus parámetros de crecimiento y el factor de conversión alimenticio.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar una dieta funcional adicionada con bacterias del género *Bacillus* con capacidad probiótica, que le proporcionen al cultivo de Tilapia del Nilo protección frente a la infección causada por *Aeromonas hydrophila*, mejoren los parámetros de crecimiento del animal y el factor de conversión alimenticio.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1.- Identificar una cepa patógena de *Aeromonas hydrophila*, productora de hemolisinas, proteasas y lipasas, y a su vez ser virulenta para el cultivo de tilapia.
- 2.- Identificar cepas de *Bacillus* productoras de proteasas, carbohidrasas y lipasas capaces de inhibir el crecimiento de *Aeromonas hydrophila*.
- 3.- Evaluar el efecto protector de las diferentes cepas de *Bacillus* añadidas a la dieta de los cultivos de Tilapia del Nilo infectados con *Aeromonas hydrophila*.
- 4.- Evaluar los parámetros de crecimiento de los cultivos de Tilapia del Nilo alimentados con las dietas adicionadas con las diferentes cepas de *Bacillus*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención del patógeno *Aeromonas hydrophila* CAIM675.

La cepa de *Aeromonas hydrophila* CAIM675 fue obtenida del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular en el departamento de Biotecnología Marina, CICESE. Posteriormente, fue sembrada en Medio Agar BHI (Infusión Cerebro Corazón) a 30°C por 24 horas para realizar los siguientes ensayos:

2.1.1 Cinética de crecimiento de *Aeromonas hydrophila* CAIM675.

Para establecer las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano y conocer sus fases de crecimiento, se realizó una curva de crecimiento probando a la bacteria en 2 medios distintos: Medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI) (MCD LAB) y Medio Luria-Bertani (LB) (BD Difco™). Al inicio, las cepas fueron sembradas en placas que contenían dichos medios durante 12 horas, posteriormente se tomó una asada de la cepa y se inoculó en medio BHI y LB durante 12 horas a 200 rpm y 30°C, pasado este tiempo se midió la densidad óptica (OD) a 600 nm. Para sincronizar los cultivos y sus réplicas hasta llegar al valor medio de OD de la fase exponencial, se inocularon 2 ml de muestra de cada medio anterior en matraces que contenían 18 ml de medio BHI y LB, durante 2 horas en las mismas condiciones. Posterior a esto, se inocularon 2 ml de dichos medios en matraces con 18 ml de medio BHI y LB de los cuáles se tomó muestra cada hora y se midió la OD a 600 nm hasta alcanzar la fase estacionaria.

2.1.2 Caracterización de los productos extracelulares (EPC) de *A. hydrophila* CAIM675

Con los datos anteriores obtenidos, se determinó en qué medio la bacteria se desempeñó mejor y posterior a ello, se caracterizaron los momentos óptimos para la producción de los EPC de *A. hydrophila* CAIM675. Siguiendo la metodología de (Khalil y Mansour, 1997) con algunas modificaciones, se realizó una curva de crecimiento de la cual se tomó una muestra a intervalos de tiempo específicos (0, 2, 4, 6, 8 horas) y se midió la densidad óptica a 600 nm de cada muestra tomada. Posteriormente, las células bacterianas fueron removidas mediante centrifugación a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. Después, las muestras

fueron filtradas y los concentrados fueron utilizados como muestras crudas de los EPC para la posterior determinación de la actividad hemolítica, proteolítica y lipolítica.

2.1.2.1 Ensayos de actividad hemolítica.

Para evaluar si las cepas presentaban actividad hemolítica, se siguió la metodología descrita por (Hammad et al., 2018) con ligeras modificaciones. Se tomaron 40µL de las muestras obtenidas previamente en la curva y fueron sembradas en pocillos marcados en placas de Agar-Sangre (AST) MCD LAB, posteriormente se incubaron a 30°C durante 24 y 48 horas. La presencia de halos de degradación alrededor de la muestra indicó la actividad hemolítica. Todos los halos fueron medidos con un micrómetro y cada ensayo se realizó por triplicado.

2.1.2.2 Ensayos de actividad proteolítica.

En placas de agar Skim milk (SM), se marcaron pocillos utilizando una puntilla estéril, a los cuáles se les añadieron 40µl de las muestras mencionadas previamente y fueron incubadas a 30°C durante 24 y 48 horas. La presencia de halos de degradación alrededor de la muestra determinó la actividad proteolítica. Todos los halos de degradación fueron medidos y cada ensayo se realizó por triplicado.

2.1.2.3 Ensayos de actividad lipolítica.

En placas de agar con aceite de soya y solución de rodamina B al 0.001% (p/v), se marcaron pocillos utilizando una puntilla estéril, a los cuáles se les añadieron 40µl de las muestras mencionadas previamente y fueron incubadas a 30°C por 24 horas. La presencia de halos de degradación alrededor de la muestra indicó la actividad lipolítica. Todos los halos fueron medidos y cada ensayo se realizó por triplicado.

2.1.3 Dosis Letal 50 en Tilapia del Nilo.

Para determinar que la cepa fuese virulenta para el cultivo de Tilapia del Nilo, se determinó la Dosis Letal 50 (LD50), siguiendo la metodología de (Reed y Muench, 1938) con ligeras modificaciones.

Previo al experimento, *Aeromonas hydrophila* CAIM675 fue crecida en medio BHI a 30°C y en agitación a 200 rpm hasta alcanzar el máximo punto de actividad de los EPC (punto de muestreo representado en la gráfica 1). La densidad óptica se midió a 600nm y se realizaron los ensayos de conteo en placa para determinar la concentración de la bacteria (UFC/ml). 10 peces con un peso promedio de (60 ± 0.5 g) fueron intraperitonealmente inoculados con *A. hydrophila* CAIM675 a una concentración de (2x10⁶ CFU/ml). Todos los signos característicos por la infección reportados por (Yardimci y Aydin, 2011) y las mortalidades fueron registradas.

2.2 Selección de cepas de *Bacillus*

Las cepas de *Bacillus* fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular del departamento de Biotecnología Marina, CICESE. Para la selección de las bacterias del género *Bacillus* con efecto protector frente a *Aeromonas hydrophila* CAIM675 y presencia de actividad enzimática se realizaron los siguientes ensayos *in-vitro*:

2.2.1 Actividad antimicrobiana

Las cepas potencialmente probióticas se inocularon en Agar Infusión de Corazón (HI) y fueron incubadas a 37° C durante 12 h. Posteriormente, cada placa fue inoculada con la cepa de *Aeromonas hydrophila* CAIM675 sembrándola cerca de las colonias de probióticos, pero sin llegar a tocarlas. Dichas placas se incubaron a 30°C durante 12 y 24 horas. Se tomaron y registraron las medidas de los halos de inhibición presentados en las placas. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

2.2.2 Cinética de crecimiento de las cepas con potencial probiótico.

Después de seleccionar las cepas que presentaron actividad antimicrobiana frente *A. hydrophila* CAIM675, se determinó la cinética de crecimiento de las 3 cepas de *Bacillus* para conocer su crecimiento, comportamiento y sus distintos tiempos de producción de metabolitos.

Las cepas fueron sembradas en medio LB durante 12 horas, posteriormente se tomó una asada de la cepa y se inoculó en Caldo LB durante 12 horas a 200 rpm y 30°C, pasado este tiempo se midió la densidad

óptica (OD) a 600 nm. Para sincronizar los cultivos y sus réplicas hasta llegar al valor medio de OD de la fase exponencial, se inocularon 2 ml de muestra del medio anterior en matraces que contenían 18 ml de Medio Schaffer, durante 3 horas en las condiciones anteriormente mencionadas. Posterior a esto, se inocularon 2 ml de dichas muestras en matraces con 18 ml de Medio Schaffer, a los cuáles se tomó muestra cada hora y se midió la OD a 600 nm hasta finalizar la fase estacionaria.

2.2.3 Ensayos de actividad enzimática

Siguiendo la metodología propuesta por (Olmos et al., 2011) con ligeras modificaciones, se determinó la actividad enzimática de las proteasas, carbohidrasas y lipasas, y la utilización de diferentes sustratos vegetales.

Brevemente, para la actividad de proteasas se utilizaron placas con Agar Skim milk (SM), para la actividad de las enzimas Glucosidasas y α -Galactosidasas se utilizaron placas con Agar Glucosa-Almidón y para la actividad enzimática de las lipasas se utilizaron placas de agar con aceite de soya y solución de rodamina B al 0.001%(p/v). Así mismo, se probó el crecimiento y actividad enzimática de las cepas en medio con trigo, maíz y harina de soya. Todas las placas fueron incubadas durante 24 y 48 h a 37°C, y cada ensayo se realizó por triplicado, se registró el tamaño del crecimiento y las zonas de degradación presentadas por cada cepa.

2.2.4 Ensayo de resistencia a antibióticos.

Siguiendo las recomendaciones del CLSI (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana, Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico) y las guías de evaluación de la susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos de importancia humana y veterinaria de la EFSA, se realizaron los ensayos de resistencia a antibióticos a las 3 cepas de *Bacillus* y a la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila* CAIM675. En placas con Agar Bacteriológico se añadieron los siguientes antibióticos: ampicilina, cloranfenicol, oxitetraciclina, eritromicina, estreptomina, clindamicina, cefalexina y doxiciclina. Dichas placas se incubaron a 30 y 37°C durante 24 horas, posteriormente se midió el crecimiento de las cepas que mostraron resistencia.

2.3 Diseño experimental del cultivo de Tilapia del Nilo.

2.3.1 Preparación de las dietas probióticas.

Se formularon 3 dietas experimentales adicionadas con el 0.1% de las diferentes cepas probióticas de *Bacillus* correspondientes, y se designaron con los siguientes nombres: Dieta K23, Dieta B2 y Dieta P3, mientras que la dieta control (sin contenido probiótico) se le designó como Dieta GC. Todas las dietas se secaron a una temperatura ambiente y luego se almacenaron hasta su uso.

Tabla 3. Información nutricional de las dietas experimentales.

Ingredientes	Dieta Control Sin probiótico	Dieta P3 <i>B. velezensis</i>	Dieta B2 <i>B.subtilis</i>	Dieta K23 <i>B.amyloliquefaciens</i>
Probiótico	0%	1%	1%	1%
Harina de pescado	10%	10%	10%	10%
Harina de soya	40%	40%	40%	40%
Harina de maíz	Se omiten porcentajes			
Harina de trigo				
Gluten de maíz				
Gelatina				
Aceite de canola				
Lecitina de soya				
Otros nutrientes				
Total	100%	100%	100%	100%

2.3.2 Periodo de aclimatación y diseño del cultivo de Tilapia del Nilo.

Se utilizaron 360 juveniles de Tilapia del Nilo (*O.niloticus*) con un peso inicial promedio de (27.30 – 38.80 g) y fueron ubicados en 2 tanques con un volumen de 2,000 L c/u, para el periodo de aclimatación.

Se les alimentó con la dieta control 2 veces al día, al 2% del peso corporal promedio durante 1 semana. Posteriormente, los peces fueron divididos en 4 grupos experimentales (correspondientes a las diferentes dietas antes mencionadas) y cada grupo contenía 12 peces por estanque, con sus correspondientes triplicados. Durante un periodo de 2 meses, los peces fueron alimentados dos veces al día hasta saciedad

y monitoreados diariamente. Los parámetros mantenidos durante el periodo de aclimatación y experimental fueron los siguientes: la calidad del agua se mantuvo renovando semanalmente alrededor del 30% del agua de crianza, la temperatura se mantuvo entre los $28 \pm 2,0$ °C, con un pH de $6,8 \pm 0,30$, a una concentración de oxígeno disuelto de $6,05 \pm 0,55$ mg/L.

2.3.3 Desempeño del crecimiento de Tilapia del Nilo.

Peso Ganado (PG). Al finalizar el ensayo, utilizando una balanza digital (insertar marca), se pesaron a todos los peces y se determinó el peso ganado (PG) mediante la siguiente ecuación:

$$: \quad PG = [PFP - PIP] / PI * 100 \quad (1)$$

Donde: PFP= Peso final promedio(g), PIP= Peso inicial promedio(g), PI= Peso inicial del pez(g).

Taza específica de crecimiento (TEC).

La tasa de crecimiento específico se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$TEC = [LnPF - LnPI] / t * 100 \quad (2)$$

Donde: Pf= Peso final, PI= Peso Inicial, t= Tiempo(días).

Coefficiente térmico de crecimiento (CTC).

El coeficiente térmico de crecimiento se calculará mediante la siguiente ecuación:

$$TGC = [(\sqrt{PF} - \sqrt{PI}) / (temperatura (^{\circ}C) \times t(días))] * 100 \quad (3)$$

Ingesta diaria de alimento (IDA).

La ingesta diaria de alimento se calculará mediante la siguiente ecuación:

$$IDA = \sum i n [Total de alimento consumido en gr] / (\# de peces) \div t(días) \quad (4)$$

Incremento en el peso inicial (IIW).

El incremento respecto al peso inicial se calculará mediante la siguiente ecuación:

$$IIW = PF/PI \quad (5)$$

2.3.4 Challenge con *Aeromonas hydrophila* CAIM675.

Después de 2 meses, todos los peces de cada tratamiento se les inoculó intraperitonealmente con 1 ml de *Aeromonas hydrophila* CAIM675 a una concentración de (2×10^6 CFU/ml), de acuerdo con la metodología propuesta por (Abarike et al., 2018; Kuebutornye et al., 2020b). La mortalidad acumulada se registró diariamente durante 15 días y el porcentaje de supervivencia se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Supervivencia} = [\text{No. final de peces}] / (\text{No. inicial de peces}) * 100 \quad (6)$$

2.4 Análisis estadístico.

Los datos se presentaron como media \pm error estándar (SE) y se probó la normalidad de todos los datos antes del análisis. Se aplicó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para probar la diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los grupos de dietas experimentales y la dieta control. También, se utilizó la prueba de rango múltiple de Tukey para detectar las diferencias significativas entre los grupos.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización de *Aeromonas hydrophila* CAIM675.

3.1.1 Cinética de crecimiento de *Aeromonas hydrophila* CAIM675.

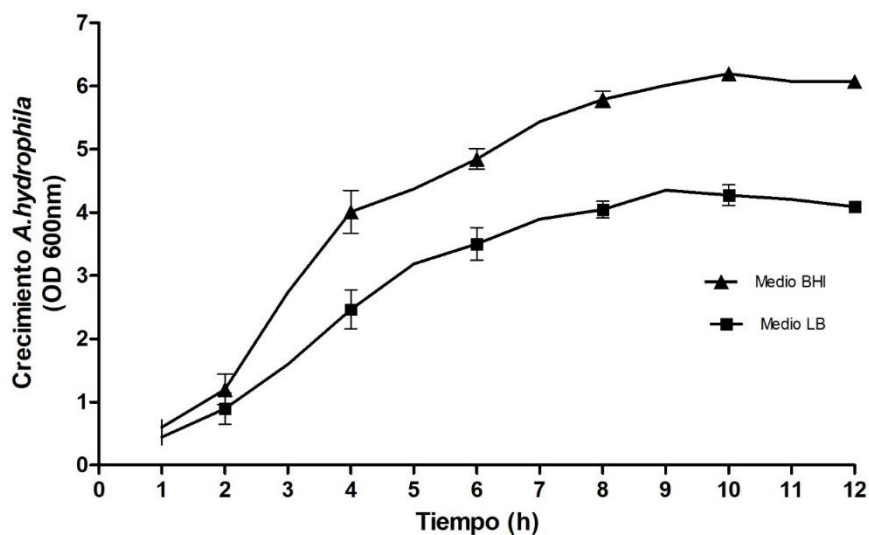


Figura 1. Curva de crecimiento de *A. hydrophila* CAIM675 en Medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI) y Medio Luria-Bertani (LB). La bacteria fue crecida a 30°C, durante 12 horas a 200 rpm.

3.1.2 Caracterización de los EPC de *Aeromonas hydrophila* CAIM675

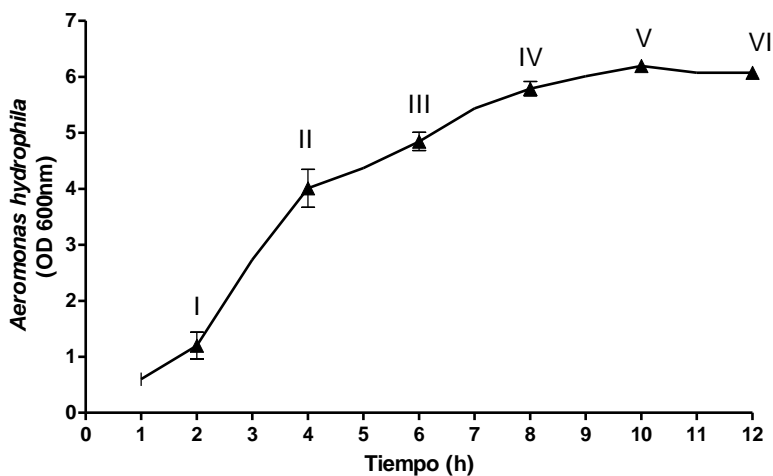


Figura 2. Obtención de EPC de *A. hydrophila* en Medio BHI. Los puntos marcados en la curva representan los distintos tiempos en los que se tomaron las muestras. La bacteria fue crecida a 30°C, durante 12 horas a 200 rpm.

Con todas las muestras obtenidas anteriormente, se determinó en que tiempos de la curva de crecimiento se produjeron los EPC y cuándo presentaron su mayor actividad. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La cepa no presentó actividad lipolítica por lo tanto se omiten las imágenes capturadas.



Figura 3. Actividad hemolítica de los EPC obtenidos en los diferentes tiempos de la curva en placas de Agar Sangre.

3.1.2.1 Ensayo de actividad hemolítica.

Las muestras con actividad hemolítica presentaron un halo de degradación alrededor de la circunferencia, las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 y 48 horas, y los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 4. Actividad hemolítica de *A. hydrophila* CAIM675

Tiempos	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
I	12.7	10.8	11.8
II	-	-	-
III	-	-	-
IV	-	-	-
V	-	-	-
VI	-	-	-

*Todos los valores son presentados en milímetros(mm). Los valores representados con el símbolo (-) indican que no se presentó actividad hemolítica. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

3.1.2.2 Ensayo de actividad proteolítica.

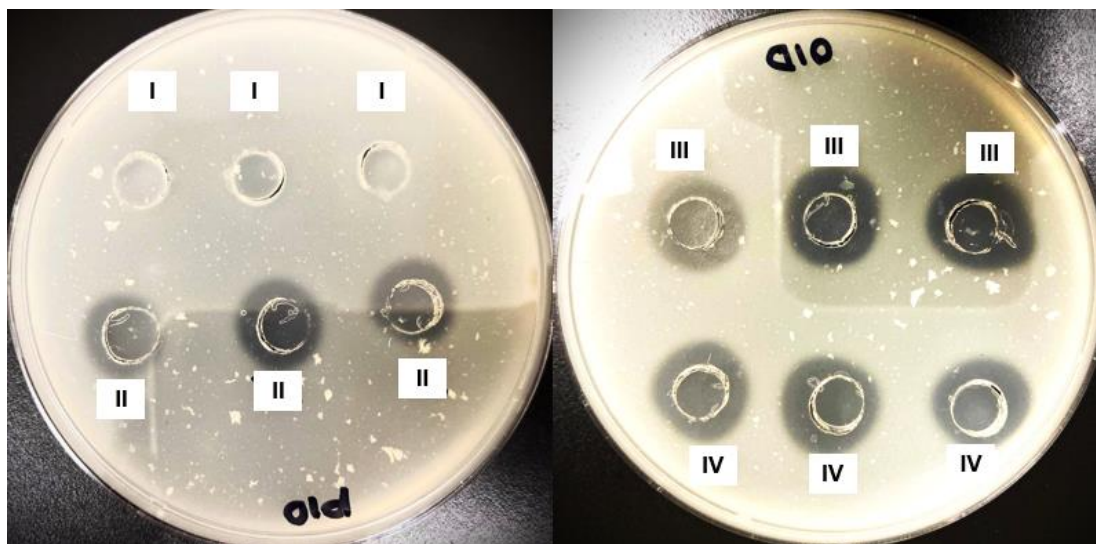


Figura 4. Actividad proteolítica de los EPC de *A. hydrophila* CAIM675 obtenidos en los diferentes tiempos de la curva en placas de Agar Skim-Milk (SM).

Las muestras con actividad hemolítica presentaron un halo de degradación alrededor de la circunferencia, las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 y 48 horas, y cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 5. Actividad proteolítica de *A. hydrophila* CAIM675

Tiempos	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
I	-	-	-
II	9.4	9.6	9.2
III	14.3	14.1	14.1
IV	12.7	12.9	13.1
V	11.6	11.8	11.2
VI	10.8	11.0	10.9

*Todos los valores son presentados en milímetros(mm). Los valores representados con el símbolo (-) indican que no se presentó actividad proteolítica. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

3.1.3 Dosis Letal 50 en Tilapia del Nilo.

72 horas después de la infección con *A. hydrophila* CAIM675 vía intraperitoneal, los peces comenzaron a mostrar síntomas como letargo, nado cerca de la superficie y la demanda de alimento disminuyó. En los días siguientes, los peces presentaron los signos característicos de la infección: hemorragias, abdomen

extendido, exoftalmia, necrosis dérmica, úlceras y enrojecimiento de aletas y branquias. Las mortalidades fueron registradas hasta que se llegó a la mitad de la población a las 96h, siendo 2×10^6 CFU/ml la concentración de la dosis letal media (LD50) para este experimento.



Figura 5. Fotografías de Tilapias infectadas con *A. hydrophila* CAIM675 vía intraperitoneal. Los peces inyectados mostraron los signos externos característicos de la infección: hemorragias, exoftalmia, úlceras, oscurecimientos de la dermis e inflamación de la zona ventral.

3.2 Selección de cepas de *Bacillus* con potencial probiótico

3.2.1 Actividad antimicrobiana

Todas las cepas mostraron actividad antimicrobiana, los halos de inhibición mayores fueron presentados por la cepa B2, seguida de la cepa P3 y la cepa K23 presentó los halos de menor tamaño. Los ensayos se realizaron en medio HI y fueron incubados a 30°C, durante 12 y 24h. Las fotos muestran los resultados a las 24 h de incubación.

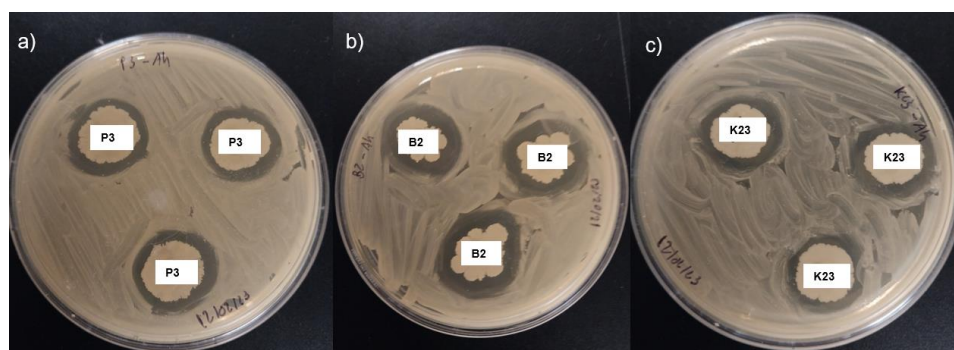


Figura 6. Ensayos de actividad antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila* CAIM675. Cepas de *Bacillus*: a) *Bacillus velzenesis* (P3), b) *Bacillus subtilis* (B2) y c) *Bacillus amyloliquefaciens* (K23) vs *A. hydrophila* CAIM675.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana de probióticos P3, B2 y K23

Cepa	12 horas	24 horas
P3	1.57	1.57
B2	2.46	2.46
K23	0.88	0.88

*Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores son presentados en cm^2 .

3.2.2 Cinética de crecimiento de las cepas con potencial probiótico.

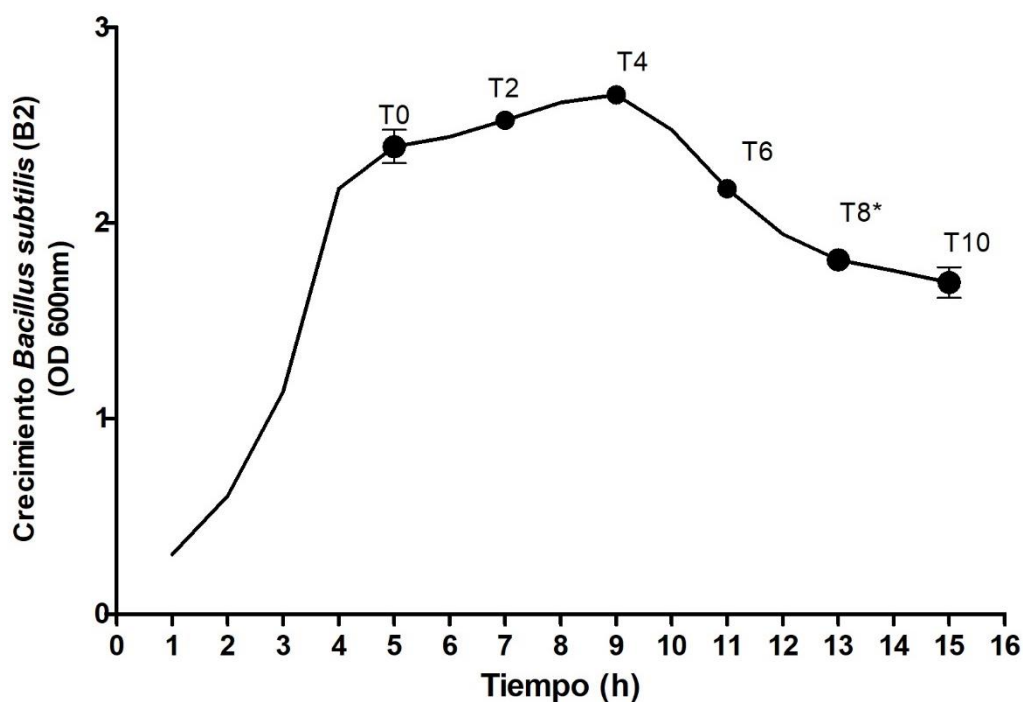


Figura 7. Curva representativa de crecimiento de la cepa B2 (*Bacillus subtilis*).

La gráfica representa el típico crecimiento de las cepas del género *Bacillus* (estilo meseta). El tiempo T0 marca el inicio de la esporulación correspondiente al final de la fase exponencial y el tiempo T8 representa la finalización del proceso de la esporulación, que es el momento en el que se toman las muestras para la preparación de las dietas. Se omiten las gráficas de las cepas P3 y K23 debido que se comportan de manera similar.

3.2.3 Ensayos de actividad enzimática

Tabla 7. Ensayos de actividad enzimática de las cepas de *Bacillus* con potencial probiótico.

Medio	P3		B2		K23	
	Crecimiento	Halo	Crecimiento	Halo	Crecimiento	Halo
Trigo	11.2	7.0	11.0	6.2	11.1	5.7
Maíz	10.8	8.4	10.9	8.0	10.3	5.0
Soya	11.5	6.8	11.7	6.9	10.5	5.7
Almidón	8.6	3.6	8.8	3.2	8.2	3.0
Skim-Milk	5.6	8.2	5.4	8.3	5.1	8.3
Ac. soya	6.6	**	6.8	**	6.3	**

*Todos los valores son representados en milímetros (mm). Los valores representados con (-) indican que no se presentó crecimiento. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

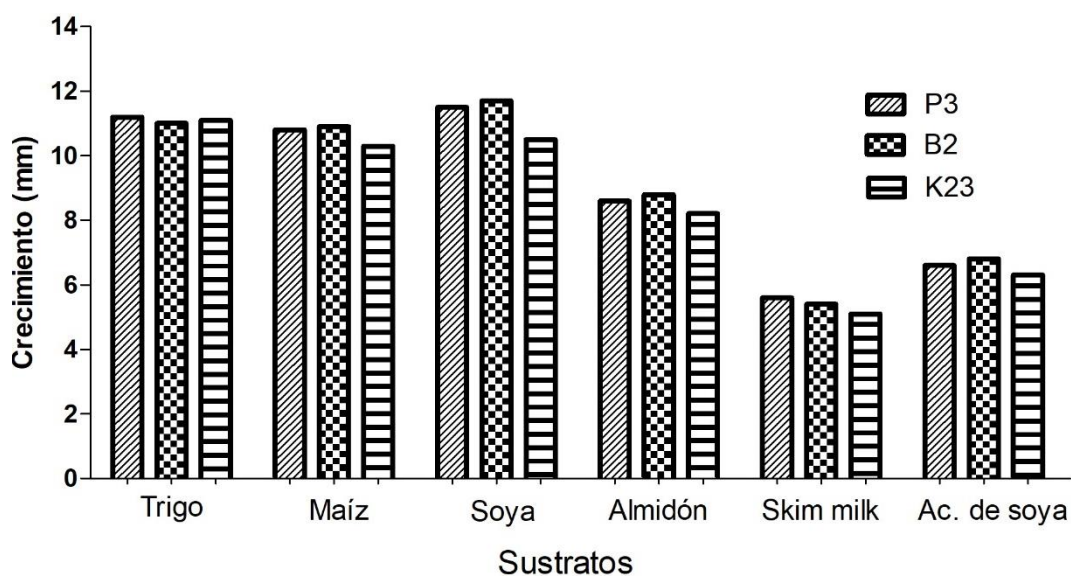


Figura 8. Crecimiento de las cepas de *Bacillus* en distintos medios de cultivo.

Todas las cepas mostraron comportamiento similar en los distintos medios de cultivo utilizados. Presentaron un buen crecimiento en los medios que contenían ingredientes vegetales, correspondientes a los utilizados en la formulación de las dietas experimentales (ver Tabla 2).

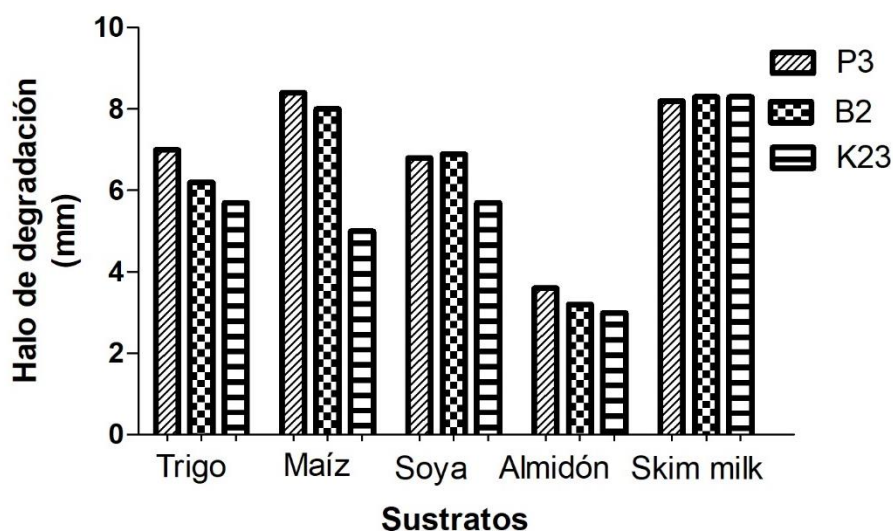


Figura 9. Actividad enzimática de las cepas de *Bacillus* en diferentes medios de cultivo.

Todas las cepas mostraron comportamiento similar en los distintos medios de cultivo utilizados. Todas las cepas presentaron halos de inhibición enzimática, incluyen los medios que contenían ingredientes vegetales, correspondientes a los utilizados en la formulación de las dietas experimentales (ver Tabla 2).

3.2.4 Ensayo de resistencia a antibióticos.

Tabla 8. Ensayos de resistencia a antibióticos.

Antibiótico/cepa	<i>B.velzenesis</i> (P3)	<i>B.subtilis</i> (B2)	<i>B.amyloliquefaciens</i> (K23)	<i>A. hydrophila</i>
Ampicilina	-	-	-	-
Cefalexina	-	-	-	-
Clindamicina	-	-	-	-
Clorafenicol	-	-	-	-
Doxicilina	-	-	-	-
Estreptomina	-	-	-	4
Eritromicina	-	-	-	-
Oxitetraciclina	-	-	-	-

*Todos los valores son representados en milímetros (mm²). Los valores representados con el símbolo (-) indican que no la cepa no presentó resistencia.

La Tabla 8 muestra los resultados de la resistencia a antibióticos de las diferentes cepas utilizadas para este proyecto. Todos los resultados de las cepas candidatas a probióticas mostraron ser negativas a la

resistencia a los distintos antibióticos. Sin embargo, el patógeno *A. hydrophila* mostró un crecimiento en el ensayo correspondiente al antibiótico estreptomicina.

3.3 Bioensayo de alimentación en Tilapia del Nilo

3.3.1 Desempeño de Tilapia del Nilo

Tabla 9. Parámetros de crecimiento de *O. niloticus* después de 40 días de consumo con la dieta control y las dietas añadidas con las diferentes cepas probióticas del género *Bacillus*.

Parámetros	Dieta Control	Dieta P3	Dieta B2	Dieta K23
PG (g)	11.861 ± 2.076	12.413 ± 1.262	22.599 ± 1.44****	14.209 ± 1.493*
PG (%)	30.62	36.79	67.83	55.10
TEC	0.422 ± 0.050	0.530 ± 0.020	0.899 ± 0.041****	0.561 ± 0.040***
CTC	0.248 ± 0.036	0.300 ± 0.025	0.518 ± 0.021****	0.416 ± 0.026***
IDA	2.211g	1.777g	1.9212g	1.802g
IPI	1.296 ± 0.045	1.3981 ± 0.036	1.718 ± 0.046****	1.82 ± 0.038***

1 Los valores corresponden a la media±SE por triplicado. 2 Los valores con (*) son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$). Parámetros: PG: Peso ganado, TEC: Tasa de crecimiento específico, CTC: coeficiente térmico de crecimiento, IDA: ingesta diaria de alimento, IPI: incremento en el peso inicial.

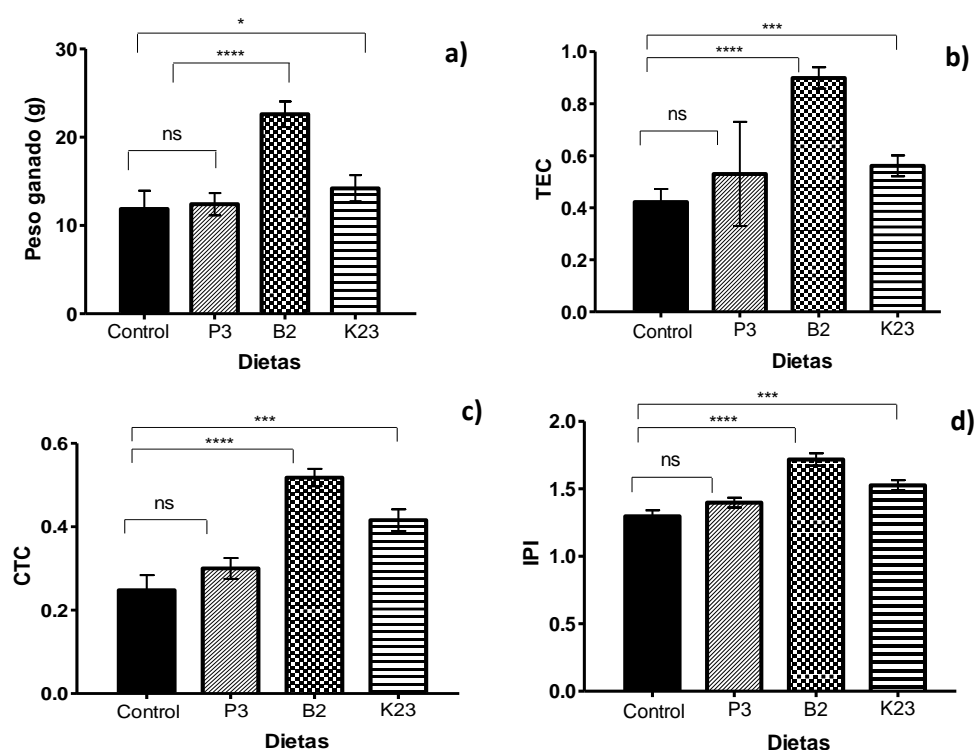


Figura 10. Desempeño de Tilapia del Nilo. 1 Los valores corresponden a la media±SE por triplicado. 2 Los valores con (*) son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). Parámetros: a) PG, b) TEC, c) CTC, d) IPI.

El bioensayo terminó a los 40 días de consumo de las diferentes dietas, todos los peces fueron pesados y los valores registrados. La mayor ganancia de peso (PG) se obtuvo en los peces alimentados con la dieta B2, observándose diferencias significativas ($p \leq 0.05$) contra la dieta control y el resto de los grupos alimentados con las dietas experimentales. Respecto a los parámetros de tasa específica de crecimiento (TEC), el coeficiente térmico de crecimiento (CTC) y el incremento del peso inicial (IPI), el grupo B2 mostró una diferencia significativa respecto al grupo control y al resto de grupos experimentales P3 y K23.

3.4 Desafío contra *A. hydrophila* CAIM675 en cultivo de Tilapia del Nilo

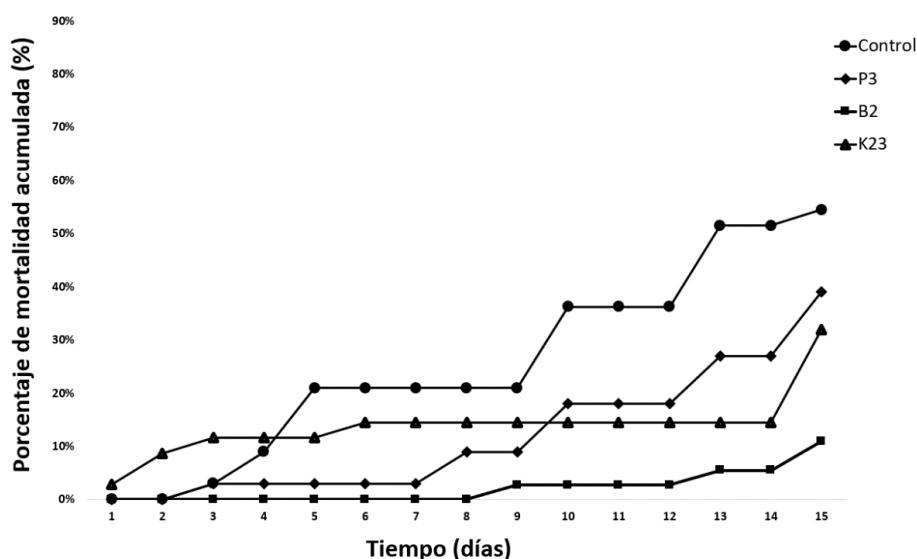


Figura 11. Porcentaje de mortalidad acumulada de *Oreochromis niloticus* alimentada con las distintas dietas experimentales y la dieta control después de 15 días de la infección con *Aeromonas hydrophila* CAIM675. Control: dieta sin probiótico. P3: Dieta control + *Bacillus velezensis*. B2: Dieta control + *Bacillus subtilis*. K23: Dieta control + *Bacillus amyloliquefaciens*, 2×10^6 CFU/g en la dieta respectivamente.

Los resultados del desafío con *A. hydrophila* en los peces alimentados con la dieta control y los diferentes probióticos durante 40 días, se muestran en la Figura 11. Todas las mortalidades fueron registradas después de la infección con *A. hydrophila* CAIM675 durante 15. La mortalidad de los peces alimentados con la dieta B2 fue significativamente menor comparada con los otros tratamientos probióticos y el grupo control. La LD50 del grupo control se presentó a los 13 días y se calculó la tasa de mortalidad acumulada de los grupos experimentales: 6% (grupo B2), 17% (grupo K23), 28% (grupo P3), respectivamente. Los signos y síntomas comunes de la infección por *Aeromonas hydrophila* CAIM675 (Figura 4) fueron presentados por los peces muertos.

Capítulo 4. Discusión

Aeromonas hydrophila posee una virulencia multifactorial asociada a sistemas de secreción, componentes estructurales, productos extracelulares (EPC), entre otros (Beaz y Figueras, 2013; Tomás, 2012). Los EPC, como hemolisinas, proteasas y lipasas, juegan un papel fundamental en el proceso de infección, sin embargo, no existe suficiente información en la literatura de los tiempos y las condiciones favorables para su producción.

En nuestra investigación *A. hydrophila* mostró un mejor desempeño en el medio de cultivo BHI, alcanzando un crecimiento significativo de 6 log CFU/ml, por encima del medio Luria-Broth (4 log CFU/ml). Autores como (Sahu et al., 2011) han probado el desempeño de *A. hydrophila* en medio de cultivo nutritivo, sin embargo los valores alcanzados se encuentran por debajo de los nuestros (3 log CFU/ml), descartando dicho medio como óptimo para el correcto desempeño de la bacteria. Existen investigaciones del desempeño de *A. hydrophila* en medio BHI (Esteve y Birbeck, 2004; Tsai et al., 1997), obteniendo resultados similares a los nuestros en los que se observó un crecimiento bacteriano y producción de EPC's mayor, comparado con los otros medios probados.

Los tipos de metabolitos y tiempos de producción son únicos de cada cepa, y pueden verse influenciados por distintos factores como los medios de cultivo utilizados y las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, rpm). En esta investigación, la producción de hemolisinas se presentó a las 4 horas de crecimiento del cultivo, momento correspondiente a la fase exponencial (Figura 1), y cuya producción no vuelve a presentarse durante el resto de la curva. A diferencia de nuestros resultados autores como (Sahu et al., 2011), reportan que la producción de hemolisinas presentada por su cepa de *A. hydrophila* fue durante la fase exponencial temprana y continuó produciéndose durante el resto de la fase exponencial.

Sin embargo, *A. hydrophila* es capaz de producir 2 clases de hemolisinas en diferentes tiempos del crecimiento bacteriano: (α y β hemolisinas). La hemolisina α se produce durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano y ocasiona lisis incompleta con efectos citotóxicos reversibles en los eritrocitos. En cambio, la hemolisina β es causante de lisis completa de los eritrocitos mediante la formación de poros en sus membranas, y se produce en la fase activa del crecimiento (exponencial) y disminuye su actividad rápidamente después, coincidiendo con los resultados presentados por nuestra cepa (Asao et al., 1986; Bernheimer y Avigad, 1974; Ljungh et al., 1981; Tomás, 2012).

Las proteasas contribuyen a la virulencia de *A. hydrophila* al proporcionarle la capacidad de sobrevivir a diversos ambientes, facilitar la invasión en los hospederos mediante la activación de toxinas o dañando directamente los tejidos (Beaz y Figueras, 2013; Fernández y Figueras, 2020; Tomás, 2012). En nuestros resultados, observamos la producción de proteasas durante toda la fase exponencial y al inicio de la estacionaria (Figura 1), a diferencia de lo reportado por (Esteve y Birbeck, 2004) quienes encontraron que la producción de proteasas de su cepa de *A. hydrophila* fue exclusivamente durante la fase estacionaria. Sin embargo, (Khalil y Mansour, 1997) reportan que la mayor producción de proteasas de su cepa *A. hydrophila* se observó durante el crecimiento exponencial tardío hasta los inicios de la fase estacionaria, coincidiendo con los datos obtenidos en nuestra investigación.

Las hemolisinas y proteasas están relacionadas directamente con los signos que presentan los cultivos de Tilapia del Nilo infectados por *A. hydrophila* como hemorragias, necrosis, exoftalmia y úlceras en la dermis (El-Bahar et al., 2019; Yardimci y Aydin, 2011), los cuáles coinciden con los signos observados en nuestros peces después de la infección con la bacteria (Figura 5). El-Bahar et al. (2019) mencionan a las hemolisinas como las responsables de generar daño tisular, hemolisis, enteritis, hemorragias y afecciones como anemia en los cultivos de peces, sin embargo Kanai y Wakabayashi (1984) señalan a las proteasas como las responsables en dañar los tejidos de los peces al provocar hemorragias locales y necrosis en el músculo.

Con nuestros resultados obtenidos y la información encontrada en la literatura, no es posible señalar a ningún producto extracelular de *A. hydrophila* como el principal causante de los signos presentados en el cultivo de Tilapia del Nilo. En nuestra cepa, las hemolisinas fueron las primeras moléculas en producirse durante el crecimiento bacteriano y podrían estar relacionadas con el inicio del daño en el huésped, posteriormente las proteasas podrían continuar con el proceso de infección potenciando el daño observado en los tejidos. Se puede inferir que ambos EPC's trabajan de manera conjunta y no se descarta la posible influencia de otros factores de virulencia reportados en la literatura, como toxinas y componentes estructurales (Citterio y Francesca, 2015; Rasmussen et al., 2016).

El uso de antibióticos es el principal método para combatir patógenos como *A. hydrophila* en los cultivos de peces, sin embargo existe un enorme riesgo en su uso; asociado con la propagación de bacterias multirresistentes, contaminaciones ambientales y problemas de seguridad alimentaria (Amábile Cuevas, 2015; Chen et al., 2020). El uso de probióticos es una alternativa a los métodos tradicionales para combatir infecciones bacterianas en los cultivos de peces, debido a la capacidad que poseen de producir metabolitos antimicrobianos, estimular el sistema inmune de los peces y, por lo tanto, mejorar el rendimiento de los cultivos (Chauhan y Singh, 2019; Olmos et al., 2020).

Al inicio del estudio, se evaluó la actividad inhibitoria *in-vitro* de las 3 diferentes especies de *Bacillus* contra *A. hydrophila*, obteniendo el halo de mayor magnitud por parte de la cepa B2 (*Bacillus subtilis*) al ser comparado con los halos presentados por la cepa P3 (*Bacillus velzenesis*) y K23 (*Bacillus amyloliquefaciens*). En el bioensayo realizado en Tilapia del Nilo, se obtuvo una menor tasa de mortalidad frente a la infección por *A. hydrophila* en los grupos experimentales comparados contra el grupo control, presentándose el menor porcentaje de mortalidad en el grupo B2 (6%) comparado al resto de los grupos experimentales, P3 (28%) y K23 (17%). Estos resultados indican que las 3 cepas probióticas de *Bacillus* presentaron una actividad antimicrobiana frente al patógeno *A. hydrophila*, sin embargo, fue la cepa B2 la que mostró una mejor respuesta inhibitoria en los ensayos *in vitro* y a su vez, mayor protección al cultivo de Tilapia del Nilo frente a la infección por la bacteria, comparado con el resto de los grupos experimentales. Existen pocos estudios que reporten la protección brindada por cepas probióticas de *Bacillus* añadidas en la dieta de la especie Tilapia del Nilo frente a la infección por *A. hydrophila*, no obstante, todos los resultados coinciden en una menor tasa de mortalidad acumulada en los peces alimentados con dietas probióticas respecto a los grupos control. Sin embargo, el porcentaje de mortalidad obtenido en el grupo alimentado con nuestra dieta experimental B2 (6%) es el porcentaje más bajo reportado hasta ahora en la literatura, 18% (Gobi et al., 2018; Mehisani et al., 2015), 20% (Won et al., 2020) y 22% (Kuebutornye et al., 2020b), respectivamente (Anexo A, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Existen diferentes mecanismos por los cuáles las diferentes especies de *Bacillus* pueden presentar actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas como *A. hydrophila* por ejemplo: péptidos antimicrobianos (bacteriocinas), enzimas líticas, antibióticos, ácidos orgánicos, quorum quenching, la competencia contra patógenos por nutrientes y la inmunoestimulación de las células del huésped (Kuebutornye et al., 2020a; Mercado y Olmos, 2022; Santos et al., 2018; Zhou et al., 2018).

Además de obtener una mayor resistencia en el cultivo de Tilapia del Nilo frente a la infección por *A. hydrophila*, los grupos alimentados con las dietas probióticas durante 40 días presentaron una mejora en el desempeño del cultivo comparados con el grupo control. El grupo B2 presentó los valores más altos de todos los parámetros medidos durante el experimento y mostró una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) frente al resto de los grupos experimentales, duplicando incluso el valor obtenido del peso ganado frente al del grupo control (Tabla 9). Olmos y Paniagua Michel (2014) mencionan que la mejora observada en el rendimiento de los cultivos alimentados con las dietas adicionadas con probióticos podría deberse a la capacidad que poseen las cepas de *Bacillus* de mejorar la salud intestinal de los peces mediante la

producción de enzimas microbianas e inducir la producción de enzimas endógenas del pez, obteniendo una mayor asimilación y utilización de los nutrientes de las dietas.

Existen algunas investigaciones que han reportado la mejora en el rendimiento de sus cultivos de Tilapia del Nilo con el uso de diferentes especies de *Bacillus* adicionadas en la dieta, en un periodo entre 30-90 días de aplicación: *Bacillus subtilis* (Won et al., 2020), *Bacillus coagulans* (Mehisan et al., 2015), *Bacillus amyloliquefaciens* (Naser et al., 2019) y *Bacillus licheniformis* (Gobi et al., 2018), obteniendo ganancias mayores respecto al grupo control (Anexo B, ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Sin embargo, el grupo B2 obtuvo la mayor ganancia en peso reportada hasta ahora en la literatura y el único que duplicó el valor del peso ganado frente al de su grupo control (Anexo B, ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

De acuerdo con los datos del 2023 reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, los macronutrientes (%) indicados para la formulación de una dieta para la especie Tilapia del Nilo son: proteína 30-35%, lípidos 10-15% y carbohidratos 40-50%. En esta investigación y en las investigaciones previamente mencionadas, las dietas se formularon dentro de estos rangos de porcentajes (Anexo C,

Tabla 10). Sin embargo, nuestra dieta contiene el menor porcentaje de harina de pescado y el mayor porcentaje

	Dieta B2	(Mehisan et al., 2015)	(Gobi et al., 2018)	(Naser et al., 2019)	(Won et al., 2020)
Proteínas	36%	36%	55%	31%	37%
Lípidos	11%	20%	10%	5.50%	6%
Carbohidratos	50%	44%	35%	45%	41%
Otros	3%	---	---	3%	16%

de harina de soya (Anexo C,

Tabla 11. Comparación de la cantidad (%) de los ingredientes proteicos en la dieta basal de Tilapia

	Dieta B2	(Mehisan et al., 2015)	(Gobi et al., 2018)	(Naser et al., 2019)	(Won et al., 2020)
Harina de pescado	10%	16%	28%	18%	17%
Harina de soya	40%	32%	49%	16%	31.50%

Otros	---	14% Harina de subproductos avícolas	---	---	5% Harina de sangre
-------	-----	---	-----	-----	------------------------

), la cual es una fuente vegetal que contiene una cantidad óptima de proteínas, carbohidratos y lípidos, además de una excelente alternativa a las fuentes proteicas de origen animal. Actualmente, el sector acuícola busca reducir el uso de ingredientes de origen animal como harina de pescado, harina de sangre, aceite de pescado y subproductos avícolas, debido a su alto costo de producción, riesgo a ocasionar enfermedades y a los problemas ambientales que generan como la sobreexplotación de la pesca y la contaminación por su alta generación de nitrógeno y fosfato (Soto, 2017; Tacon y Metian, 2008).

No obstante, los peces no poseen la maquinaria enzimática digestiva necesaria para el consumo de altas cantidades de ingredientes vegetales, debido a su contenido de carbohidratos complejos, inhibidores de proteasas y otros factores que resultan ser anti nutricionales al ocasionar daños y patologías severas en su tracto digestivo. Sin embargo, en este estudio los grupos alimentados con las dietas adicionadas con cepas probióticas de *Bacillus* no solamente fueron capaces de asimilar y digerir los nutrientes provenientes de fuentes vegetales, también mostraron un mejor desempeño frente al grupo control. El mecanismo por el cuál las cepas de *Bacillus* brindan a los cultivos acuícolas la capacidad de utilizar nutrientes de origen vegetal sin ocasionarles daños intestinales, es debido a su amplia secreción de enzimas como carbohidrolasas, proteasas y lipasas. Estas enzimas son capaces de degradar sustratos vegetales y brindar al cultivo una correcta digestión y asimilación de las dietas (Olmos y Paniagua Michel, 2014; Soltani et al., 2019; Soto, 2017).

De acuerdo con Kumar et al. (2022) un alimento funcional más allá de los efectos nutricionales adecuados, es aquel que demuestre ser satisfactorio y beneficie una o más funciones en el huésped, mejore el estado de salud del mismo y reduzca su riesgo a enfermedades. Diversos autores han reportado la aplicación de alimentos funcionales añadidos con cepas de *Bacillus* en sistemas acuícolas, *Litopenaeus vannamei* (Olmos et al., 2011), Tilapia del Nilo (Addo et al., 2017), *Pagrus major* (Zaineldin et al., 2021), *Totoaba macdonaldi* (Olmos et al., 2022), que al remplazar ingredientes de origen animal por fuentes de origen vegetal lograron mejorar el rendimiento de sus cultivos y obtener una dieta exitosa y rentable, además de ser amigable con el medio ambiente.

Capítulo 5. Conclusiones

La baja calidad en el agua, el uso de sistemas intensivos, y la acumulación de desechos debido a una sobrealimentación, generan una mayor susceptibilidad de enfermedades en los cultivos, especialmente a las infecciones por patógenos oportunistas. Un cultivo de Tilapia del Nilo alimentado con una dieta funcional adicionada con bacterias probióticas del género *Bacillus*, fue capaz de brindar protección frente a la infección por *A. hydrophila* al disminuir el porcentaje de mortalidad en todos los grupos experimentales respecto al grupo control. El grupo B2 presentó la menor tasa de mortalidad y se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) respecto al resto de los grupos experimentales. Así mismo, la dieta funcional formulada a base de fuentes vegetales y adicionada con cepas probióticas del género *Bacillus*, mejoró los parámetros de crecimiento y rendimiento del cultivo, siendo el grupo B2 el que mayor desempeño mostró respecto al grupo control y el resto de las dietas experimentales ($p \leq 0.05$). El uso de alimentos funcionales adicionados con bacterias probióticas en los sistemas acuícolas son una excelente opción para remplazar el uso de antibióticos, ya que son capaces de brindarle al cultivo: protección frente a patógenos, promover la salud intestinal de los peces y mejorar el desempeño del cultivo.

Literatura citada

- Abarike, E. D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., Tang, J., Jun, L., & Kuebutornye, F. K. (2018). Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, *82*, 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.037>.
- Aboyadak, I., Ali, N., Goda, A., Saad, W., & Salam, A. (2017). Non-selectivity of RS media for *Aeromonas hydrophila* and TCBS media for *Vibrio* species isolated from diseased *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquaculture Research & Development*, *8*(496), 1-5. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000496>
- Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS microbiology reviews*, *35*(1), 201-232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- 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. <https://doi.org/10.1111/jwas.12380>
- Aly, S. M., Mohamed, M. F., & John, G. (2008). Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, *39*(6), 647-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01932.x>
- Amábile Cuevas, C. F. (2015). *Antibiotics and antibiotic resistance in the environment* (Vol. 8). CRC Press.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1— Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, *17*(6), 454-461. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.02.006>
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., & Balasubramanian, T. (2013). Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate polymers*, *94*(1), 409-415. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.066>
- Arnadottir, H., Hvanndal, I., Andresdottir, V., Burr, S. E., Frey, J., & Gudmundsdottir, B. K. (2009). The AsaP1 peptidase of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* is a highly conserved deuterolysin metalloprotease (family M35) and a major virulence factor. *Journal of bacteriology*, *191*(1), 403-410. <https://doi.org/10.1128/jb.00847-08>
- Asao, T., Kozaki, S., Kato, K., Kinoshita, Y., Otsu, K., Uemura, T., & Sakaguchi, G. (1986). Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Journal of clinical microbiology*, *24*(2), 228-232. <https://doi.org/10.1128/jcm.24.2.228-232.1986>
- Azevedo, R. V., Fosse Filho, J. C., Cardoso, L. D., Mattos, D., Vidal Júnior, M., & Andrade, D. (2015). Economic evaluation of prebiotics, probiotics and symbiotics in juvenile Nile tilapia. *Revista Ciência Agronômica*, *46*, 72-79. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902015000100009>

- Bach, R., Chen, P., & Chapman, G. (1978). Changes in the spleen of the channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque induced by infection with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of fish diseases*, 1(3), 205-217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1978.tb00023.x>
- Bairagi, A., Ghosh, K., Sen, S., & Ray, A. (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10, 109-121. <https://doi.org/10.1023/A:1021355406412>
- Beaz, R., & Figueras, M. (2013). *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of fish diseases*, 36(4), 371-388. <https://doi.org/10.1111/jfd.12025>
- Bernheimer, A. W., & Avigad, L. S. (1974). Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 9(6), 1016-1021. <https://doi.org/10.1128/iai.9.6.1016-1021.1974>
- Bharathi, S., Antony, C., Cbt, R., Arumugam, U., Ahilan, B., & Aanand, S. (2019). Functional feed additives used in fish feeds. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 7(3), 44-52. <https://dx.doi.org/10.22271/fish>
- Biziulevičius, G. A., & Pukaitė, V. (2002). Comparative antimicrobial activity of lysosubtilin and its acid-resistant derivative, Ferosorb. *International journal of antimicrobial agents*, 20(1), 65-68. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00117-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00117-6)
- Cai, J., Zhou, X., Xue, Y., Lucente, D., & Lagana, C. (2019). *Top 10 species groups in global aquaculture 2017* (Rome: Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Issue. <https://www.fao.org/3/ca5224en/ca5224en.pdf>
- Cai, Y., Yuan, W., Wang, S., Guo, W., Li, A., Wu, Y., Chen, X., Ren, Z., & Zhou, Y. (2019). In vitro screening of putative probiotics and their dual beneficial effects: to white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae and to the rearing water. *Aquaculture*, 498, 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.024>
- Chacón, M., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J., & Figueras, M. (2002). A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 44(3), 221-225. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00455-8](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00455-8)
- Chauhan, A., & Singh, R. (2019). Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis*, 77(2), 99-113. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0580-1>
- Chen, J., Sun, R., Pan, C., Sun, Y., Mai, B., & Li, Q. X. (2020). Antibiotics and food safety in aquaculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(43), 11908-11919. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03996>
- Citterio, B., & Francesca, B. (2015). *Aeromonas hydrophila* virulence. *Virulence*, 6(5), 417-418. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1058479>
- Da Silva, B. C., Mouriño, J. L. P., Vieira, F. N., Jatobá, A., Seiffert, W. Q., & Martins, M. L. (2012). Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*×*Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 43(6), 908-916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02905.x>

- Dahdouh, B., Basha, O., Khalil, S., & Tanekhy, M. (2016). Molecular Characterization, Antimicrobial Susceptibility and Salt Tolerance of *Aeromonas hydrophila* from Fresh, Brackish and Marine fishes. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 48, 46. <https://doi.org/10.5455/ajvs.208107>
- Dallaire, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., & Charette, S. J. (2014). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*, 169(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.025>
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., & Verstraete, W. (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, 240(1-4), 69-88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.031>
- Dong, J., Liu, Y., Xu, N., Yang, Q., & Ai, X. (2018). Morin protects channel catfish from *Aeromonas hydrophila* infection by blocking aerolysin activity. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2828. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02828>
- Eggset, G., Bjørnsdottir, R., Leifson, R. M., Arnesen, J., Coucheron, D., & Jørgensen, T. (1994). Extracellular glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase from *Aeromonas salmonicida*: activation by serine protease. *Journal of fish diseases*, 17(1), 17-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00342.x>
- El-Bahar, H. M., Ali, N. G., Aboyadak, I. M., Khalil, S. A. E. S., & Ibrahim, M. S. (2019). Virulence genes contributing to *Aeromonas hydrophila* pathogenicity in *Oreochromis niloticus*. *International Microbiology*, 22, 479-490. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00075-3>
- El-Sayed, A. F. M. (2006). Stress and diseases. CABI Pub (Ed.), *Tilapia Culture* (pp. 140-148). CABI Publishing.
- El-Sayed, A. F. M. (2020a). Tilapia distribution, transfers and introductions. In Elsevier Science (Ed.), *Tilapia Culture* (2nd ed.). (pp. 33-45). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-04085-5>
- El-Sayed, A. F. M. (2020b). Tilapia trade and marketing. In Elsevier Science (Ed.), *Tilapia Culture* (2nd ed.). (pp. 261-274). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-04085-5>
- Elkemary, M., Yehia, N., Elsheshtawy, A., & Soliman, H. (2019). Investigation of Nile tilapia Summer Mortality in Kafr El-Sheikh Governorate, Egypt. *Genetics of Aquatic Organisms*, 3, 17-25. https://doi.org/10.4194/2459-1831-v3_1_03
- Ellis, A. (1991). An appraisal of the extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Journal of fish diseases*, 14(3), 265-277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00824.x>
- Esteve, C., & Birbeck, T. (2004). Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase). *Journal of applied microbiology*, 96(5), 994-1001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02227.x>
- Faktorovich, K. A. (1969). Histological Changes in the Liver, Kidneys, Skin and Brain of Fish Sick with Red Rot. *Diseases of Fish and Their Control*(Division of Fisheries Research, Bureau of Sport Fisheries and Wildlife), 83-101.

- FAO. Fisheries and Aquaculture Division. (2006, May 19). *Oreochromis niloticus*. Cultured Aquatic Species Information Programme. https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/oreochromis_niloticus/en
- Faruk, M. A. R., & Anka, I. Z. (2017). An overview of diseases in fish hatcheries and nurseries. *Fundamental and Applied Agriculture*, 2(3), 311-316. <https://doi.org/10.5455/faa.277539>
- Feng, C., Liu, X., Hu, N., Tang, Y., Feng, M., & Zhou, Z. (2022). *Aeromonas hydrophila* Ssp1: A secretory serine protease that disrupts tight junction integrity and is essential for host infection. *Fish & shellfish immunology*, 127, 530-541. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.068>
- Fernández, A., & Figueras, M. J. (2020). An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>
- Figueras, M. J., Beaz-Hidalgo, R., Paredes, K. (2011). Furunculosis y otras infecciones producidas por *Aeromonas*. *Enfermedades infecciosas del cultivo de Salmónidos en Chile y el Mundo.*, 285-374.
- Fitzsimmons, K. (2000). Future trends of tilapia aquaculture in the Americas. En: Costa, B & Rakocy, J (Eds.), *Tilapia aquaculture in the Americas*, 252-264. World Aquaculture Society (WAS).
- Gobi, N., Vaseeharan, B., Chen, J.-C., Rekha, R., Vijayakumar, S., Anjugam, M., & Iswarya, A. (2018). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish & shellfish immunology*, 74, 501-508. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.066>
- Gómez, G. D., & Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2), 145-154. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x>.
- Guo, J. J., Liu, K. F., Cheng, S. H., Chang, C. I., Lay, J. J., Hsu, Y. O., Yang, J. Y., & Chen, T. I. (2009). Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research*, 40(5), 609-618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02140.x>
- Gupta, A., Gupta, P., & Dhawan, A. (2014). Dietary supplementation of probiotics affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* fry. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.023>
- Hammad, A. M., Moustafa, A.-E. H., Mansour, M. M., Fahmy, B. M., Hamada, M. G., Shimamoto, T., & Shimamoto, T. (2018). Molecular and Phenotypic Analysis of Hemolytic *Aeromonas* Strains Isolated from Food in Egypt Revealed Clinically Important Multidrug Resistance and Virulence Profiles. *Journal of food protection*, 81(6), 1015-1021. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-360>
- Harper, C., & Wolf, J. C. (2009). Morphologic effects of the stress response in fish. *ILAR journal*, 50(4), 387-396. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.387>
- Hassanein, S., & Soliman, N. (2010). Effect of Probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) Adding to Diets on Intestinal Microflora and Performance of Hy-Line Layers Hens. *Journal of American Science*, 6. <https://doi.org/10.7537/marsjas061110.21>

- Hoch, J. A., & Losick, R. (1993). *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria*. American Society for Microbiology.
- Hoseinifar, S. H., Ringo, E., Shenavar Masouleh, A., & Esteban, M. Á. (2016). Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 8(1), 89-102. <https://doi.org/10.1111/raq.12082>
- Hossain, M. J., Waldbieser, G. C., Sun, D., Capps, N. K., Hemstreet, W. B., Carlisle, K., Griffin, M. J., Khoo, L., Goodwin, A. E., & Sonstegard, T. S. (2013). Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish. *PLoS One*, 8(11), e80943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080943>
- Huicab, Z., Landeros, C., Castañeda, M., Lango-Reynoso, F., López, C., & Platas, D. (2016). Current state of bacteria pathogenicity and their relationship with host and environment in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of aquaculture research and development*, 7(5), 1-10. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000428>
- Huizinga, H., Esch, G. W., & Hazen, T. C. (1979). Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede). *Journal of fish diseases*, 2(4), 263-277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1979.tb00169.x>
- Ibrahim, T. (2019). Diseases of Nile Tilapia with Special Emphasis on Water Pollution. *Journal of Environmental Science and Technology*, 13, 29-56. <https://doi.org/10.3923/jest.2020.29.56>
- Ichimatsu, T., Mizuki, E., Nishimura, K., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K., & Ohba, M. (2000). Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Current Microbiology*, 40, 217-220. doi: <https://doi.org/10.1007/s002849910044>
- Jiravanichpaisal, P., Roos, S., Edsman, L., Liu, H., & Söderhäll, K. (2009). A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(1), 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.002>
- Kajimura, Y., & Kaneda, M. (1996). Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)*, 49(2), 129-135. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.129>
- Kanai, K., & Wakabayashi, H. (1984). Purification and Same Properties of Protease from *Aeromonas hydrophila*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50(8), 1367-1374. <https://doi.org/10.2331/suisan.50.1367>
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS microbiology reviews*, 3(3), 233-244. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(87\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0378-1097(87)90110-8)
- Kayansamruaj, P., Areechon, N., & Unajak, S. (2020). Development of fish vaccine in Southeast Asia: A challenge for the sustainability of SE Asia aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 103, 73-87. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.031>
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Katagiri, T., Hirono, I., & Rodkhum, C. (2014). Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(4), 488-495. <https://doi.org/10.1177/1040638714534237>

- Khalil, A., & Mansour, E. (1997). Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, *Tilapia nilotica*. *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 269-273. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00220.x>
- Kim, D.-H., & Austin, B. (2006). Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary immunology and immunopathology*, 114(3-4), 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.08.015>
- Kirov, S. M. (1997). *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. Food microbiology, Fundamentals and frontiers, (pp. 265-287). Academic Press.
- Kong, W., Huang, C., Tang, Y., Zhang, D., Wu, Z., & Chen, X. (2017). Effect of *Bacillus subtilis* on *Aeromonas hydrophila*-induced intestinal mucosal barrier function damage and inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Scientific Reports*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01336-9>
- Kuebutornye, F., Abarike, E., Lu, Y., Hlordzi, V., Sakyi, M., Afriyie, G., Wang, Z., Li, Y., & Xie, C. (2020a). Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture. *Fish physiology and biochemistry*, 46, 819-841. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00754-y>
- Kuebutornye, F., Wang, Z., Lu, Y., Abarike, E., Sakyi, M. E., Li, Y., Xie, C. X., & Hlordzi, V. (2020b). 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 & shellfish immunology*, 97, 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.046>
- Kumar, M. S., Buttar, H. S., Dalal, Y., & Singh, R. B. (2022). Cardioprotective and neuroprotective effects of nutraceuticals derived from marine origin. In R. B. Singh, S. Watanabe, & A. A. Isaza (Eds.), *Functional Foods and Nutraceuticals in Metabolic and Non-Communicable Diseases* (pp. 707-723). Academic Press.
- 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, 471-496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- Leung, K., & Stevenson, R. (1988). Tn5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infection and Immunity*, 56(10), 2639-2644. <https://doi.org/10.1128/iai.56.10.2639-2644.1988>
- Liu, C.-H., Chiu, C.-H., Wang, S.-W., & Cheng, W. (2012). Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & shellfish immunology*, 33(4), 699-706. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.012>
- Liu, D. (2015). Chapter 61- *Aeromonas*. In Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, & J. Schwartzman (Eds.), *Molecular Medical Microbiology*. (pp. 1099-1110). Academic Press.
- Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., & Zheng, Y. (2017). Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, 60, 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.003>

- Ljungh, A., Wretling, B., & Möllby, R. (1981). Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Pathol Microbiol Scand B*, 89(6), 387-397. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1981.tb00205_89b.x
- Luis, I., Macías, M., Gómez, B., Ascencio, F., & Campa, Á. (2011). Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 321(1-2), 136-144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.036>
- Luo, L., Xu, Q., Xu, W., Li, J., Wang, C., Wang, L., & Zhao, Z. (2020). Effect of *Bacillus megaterium*-Coated Diets on the Growth, Digestive Enzyme Activity, and Intestinal Microbial Diversity of Songpu Mirror Carp *Cyprinus specularis* Songpu. *Biomed Research International* 2020, 8863737. <https://doi.org/10.1155/2020/8863737>
- Mathiesen, Á. M. (2015). The state of world fisheries and aquaculture 2012. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/81ea54da-0f65-56c6-91d2-8257b8ac4136>
- Mehisan, M., El-moghazy, G., El-Sayed, A. E.-K., Iraqi, M., & Soltan, M. (2015). Role of probiotics in improving growth performance, immunity and controlling *Aeromonas hydrophila* in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 19(3), 55-70. <https://doi.org/10.21608/EJABF.2015.2271>
- Mercado, V., & Olmos, J. (2022). Bacteriocin production by *Bacillus* species: Isolation, characterization, and application. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(6), 1151-1169. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09966-w>
- Motta, A. S., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2004). Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 307-310. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300007>
- Muñoz, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., Del Campo, R., Hernández, P. E., Herranz, C., & Cintas, L. M. (2013). Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC microbiology*, 13, 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113496>
- Naser, M. E., El-Motaal, A., Sabry, M., El-Sheikh, S. M., & Mahmoud, S. H. (2019). Effects of commercial and fish isolated gut *Bacillus* strains supplementation on the performance of *Oreochromis niloticus* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Egyptian Journal for Aquaculture*, 9(1), 61-75. <https://doi.org/10.21608/EJA.2019.33105>
- Ochoa, J., & Olmos, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food microbiology*, 23(6), 519-525. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.10.004>
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., & Pitones, V. (2020). *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*, 202, 427-435. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01757-2>.
- Olmos, J., López, L. M., Gorriño, A., Galaviz, M. A., & Mercado, V. (2022). *Bacillus subtilis* Effects on Growth Performance and Health Status of *Totoaba macdonaldi* Fed with High Levels of Soy Protein Concentrate. *Animals*, 12(23), 3422. <https://doi.org/10.3390/ani12233422>

- Olmos, J., Ochoa, 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. <https://doi.org/10.3390/md9061119>
- Olmos, J., & Paniagua Michel, J. (2014). *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 6(7), 361-365. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000169>
- 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), 28. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02987-z>
- Olmos Soto, J., Paniagua-Michel, J. d. J., Lopez, L., & Ochoa, L. (2015). Functional feeds in aquaculture. *Springer handbook of marine biotechnology*, 1303-1319. https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8_59
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., & Sugita, H. (2004). Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102(4), 379-388. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.08.006>
- Parker, J. L., & Shaw, J. G. (2011). *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*, 62(2), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.12.003>
- Peatman, E., Mohammed, H., Kirby, A., Shoemaker, C. A., Yildirim-Aksoy, M., & Beck, B. H. (2018). Mechanisms of pathogen virulence and host susceptibility in virulent *Aeromonas hydrophila* infections of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 482, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.019>
- Pemberton, J. M., Kidd, S. P., & Schmidt, R. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 152(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10401.x>
- Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Mégraud, F., & Urdaci, M. C. (2001). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(11), 3156-3161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3156-3161.2001>
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., & Endo, M. (2006). Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary immunology and immunopathology*, 113(3-4), 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.06.003>
- Podolak, R. K., Zayas, J. F., Kastner, C. L., & Fung, D. Y. C. (1996). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on Beef by Application of Organic Acids (†). *Journal of food protection*, 59(4), 370-373. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.4.370>
- Rasmussen, C. R., Figueras, M. J., McGarey, D., & Liles, M. R. (2016). Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 1337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337>

- Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringo, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465-492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>
- Reda, R. M., & Selim, K. M. (2015). Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 23, 203-217. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9809-z>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Ringo, E., Myklebust, R., Mayhew, T. M., & Olsen, R. E. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268(1), 251-264. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.047>
- Rodger, H. D. (2016). Fish Disease Causing Economic Impact in Global Aquaculture. In A. Adams (Ed.), *Fish vaccines* (pp. 1-34). Springer Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1_1
- Romana, M., R, R., Eguia, R. V., & Pakingking Jr, R. V. (2020). *Tilapia culture: The basics*. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Sahu, I., Das, B., Marhual, N., Samanta, M., Mishra, B., & Eknath, A. (2011). Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* on Rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Indian journal of microbiology*, 51, 515-520. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0182-6>
- Santos, R. A., Oliva-Teles, A., Saavedra, M. J., Enes, P., & Serra, C. R. (2018). *Bacillus* spp. as source of Natural Antimicrobial Compounds to control aquaculture bacterial fish pathogens. International Meeting on Marine Research 2018, ESTM - Polytechnic Institute of Leiria, Santuário Nossa Senhora dos Remédios, Peniche, Portugal.
- Sato, T., Nagai, K., Suzuki, K., Morioka, M., Saito, T., Nohara, C., Susaki, K., & Takebayashi, Y. (1992). A new isocoumarin antibiotic, Y-05460M-A. *The Journal of Antibiotics* 45(12), 1949-1952. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.1949>
- Sen, K., & Rodgers, M. (2004). Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of applied microbiology*, 97(5), 1077-1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02398.x>
- Sha, J., Kozlova, E., & Chopra, A. (2002). Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infection and Immunity*, 70(4), 1924-1935. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1924-1935.2002>
- Shieh, H. S. (1987). Protection of Atlantic salmon against motile aeromonad septicaemia with *Aeromonas hydrophila* protease. *Microbios letters*, (pp. 133-138). Faculty Press.
- Singh, D., & Sanyal, S. (1992). Production of haemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas* spp. *Journal of medical microbiology*, 37(4), 262-267. <https://doi.org/10.1099/00222615-37-4-262>

- Snijders, J., Van Logtestijn, J., Mossel, D., & Smulderst, F. (1985). Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *Veterinary Quarterly*, 7(4), 277-282. <https://doi.org/10.1080/01652176.1985.9694000>
- So-Young, K., Seung-Ho, O., Dong-Hoon, B., & Ju-Hyun, Y. (1999). Purification and Properties of Bacteriolytic Enzymes from *Bacillus licheniformis* YS-1005 against *Streptococcus mutans*. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.73>
- Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S. H., Kumar, V., Lymbery, A. J., Roy, S., & Ringo, 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 & Aquaculture*, 27(3), 331-379. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>
- Soto, J. O. (2017). *Bacillus* probiotic enzymes: External auxiliary apparatus to avoid digestive deficiencies, water pollution, diseases, and economic problems in marine cultivated animals. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 80, pp. 15-35). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.001>
- Sturr, M. G., Guffanti, A. A., & Krulwich, T. A. (1994). Growth and bioenergetics of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 in continuous culture at high pH. *Journal of bacteriology*, 176(11), 3111-3116. <https://doi.org/10.1128/jb.176.11.3111-3116.1994>
- Suva, M. A., Sureja, V. P., & Kheni, D. B. (2016). Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: Mechanism of action and clinical applications. *Journal of Current Research in Scientific Medicine*, 2(2), 65. <https://doi.org/10.4103/2455-3069.198381>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics. In E. Ricca, A. Henriques, & S. Cutting (Eds.), *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications* (Vol. 285) (pp. 146-158). Horizon Bioscience.
- Telli, G., Ranzani-Paiva, M., Sussel, F., Ishikawa, C., & Tachibana, L. (2014). Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & shellfish immunology*, 39(2), 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.025>
- Tomás, J. (2012). The main *Aeromonas* pathogenic factors. *International Scholarly Research Notices*, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/256261>
- Tsai, G.-J., Tsai, F.-C., & Kong, Z.-L. (1997). Effects of temperature, medium composition, pH, salt and dissolved oxygen on haemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster. *International journal of food microbiology*, 38(2-3), 111-116. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00094-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00094-9)
- Urdaci, M., & Pinchuk, I. (2004). Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics. In: Ricca, E., Henriques, A. & Cutting, S. (Eds.), *Bacterial spore formers—Probiotics and emerging applications*, (pp. 171-182). Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
- Vajargah, M. (2021). A review of the physiology and biology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 10(5), 244-246. <https://doi.org/10.15406/jamb.2021.10.00328>

- Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and environmental microbiology* 66(3), 1139-1146. <https://doi.org/10.1128/aem.66.3.1139-1146.2000>
- Watanabe, W. O., Losordo, T. M., Fitzsimmons, K., & Hanley, F. (2002). Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends, and challenges. *Reviews in fisheries science*, 10(3-4), 465-498. <https://doi.org/10.1080/20026491051758>
- Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Park, Y., Jang, W. J., Kong, I.-S., & Bai, S. C. (2020). Effects of *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactococcus lactis* on growth, immune responses, histology and gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010067>
- Xia, C., Ma, Z.-H., Rahman, M. H., & Wu, Z.-G. (2004). PCR cloning and identification of the β -haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. *Aquaculture*, 229(1), 45-53. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00398-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00398-3)
- Xu, Q., Wang, J., Wang, L., Wang, C., Li, J., Zhao, Z., Luo, L., Du, X., & Li, W. (2017). Effect of *Bacillus megaterium* to plant protein meal on digestive enzyme activity and intestinal morphology of juvenile hybrid sturgeon. *The Chinese Journal of Northeast Agricultural University*, 48(5), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.07.033>
- Yambot, A., & Inglis, V. (1994). *Aeromonas Hydrophila* Isolated from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) with "eye Disease". International congress on quality veterinary services for 21st century, Kuala Lumpur, 88-87.
- Yang, G., Chen, M., Yu, Z., Lu, Q., & Zhou, S. (2013). *Bacillus composti* sp. nov. and *Bacillus thermophilus* sp. nov., two thermophilic, Fe (III)-reducing bacteria isolated from compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 8), 3030-3036. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.049106-0>
- Yang, W., Li, N., Li, M., Zhang, D., & An, G. (2016). Complete genome sequence of fish pathogen *Aeromonas hydrophila* JBN2301. *Genome Announcements*, 4(1), e01615-01615. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01615-15>
- Yardimci, B., & Aydin, Y. (2011). Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 58(1), 47-54. https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002448
- Zaineldin, A. I., Hegazi, S., Koshio, S., Ishikawa, M., El Basuini, M. F., Dossou, S., & Dawood, M. A. (2021). The influences of *Bacillus subtilis* C-3102 inclusion in the red sea bream diet containing high levels of soybean meal on growth performance, gut morphology, blood health, immune response, digestibility, digestive enzymes, and stress resistance. *Aquaculture Nutrition*, 27(6), 2612-2628. <https://doi.org/10.1111/anu.13389>
- Zhang, L. H., & Dong, Y. H. (2004). Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Molecular microbiology*, 53(6), 1563-1571. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04234.x>

- Zhou, S., Xia, Y., Zhu, C., & Chu, W. (2018). Isolation of marine *Bacillus* sp. with antagonistic and organic-substances-degrading activities and its potential application as a fish probiotic. *Marine drugs*, *16*(6), 196. <https://doi.org/10.3390/md16060196>
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., & Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish physiology and biochemistry*, *36*, 501-509. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9320-z>

Anexo A

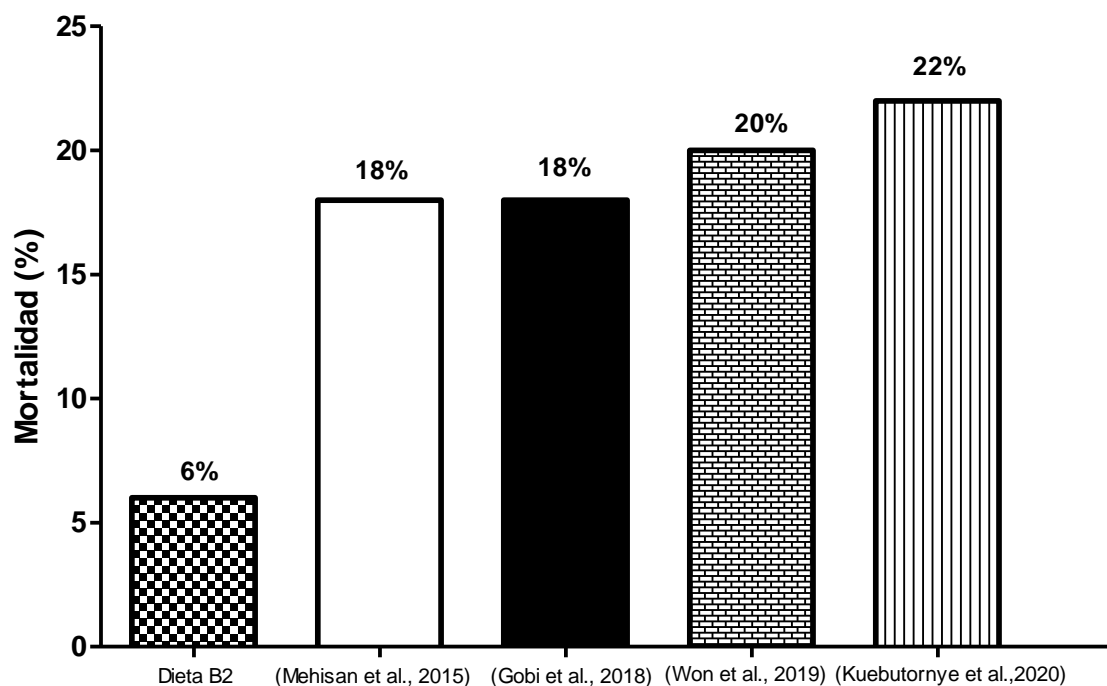


Figura 12. Comparación de la mortalidad acumulada (%) en Tilapia del Nilo alimentada con la dieta B2 después de la infección por *Aeromonas hydrophila*, respecto a investigaciones previas.

Los datos corresponden a la comparación de porcentajes de mortalidad acumulada en la especie Tilapia del Nilo alimentadas con las diferentes dietas adicionadas con cepas probióticas de *Bacillus* después del reto con *A. hydrophila*. Se puede observar que el porcentaje de mortalidad de la dieta B2 (*Bacillus subtilis*) utilizada en este estudio se encuentra muy por debajo del resto de las dietas experimentales reportadas en la literatura hasta ahora, *Bacillus coagulans* (Mehisan et al., 2015), *Bacillus licheniformis* (Gobi et al., 2018), *Bacillus subtilis* (Won et al., 2020) y *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* (Kuebutornye et al., 2020b).

Anexo B

Los datos corresponden a la comparación del peso ganado (g) en la especie Tilapia del Nilo alimentada con nuestra dieta control (DC) y la dieta experimental (DE) B2 contra los resultados reportados del peso ganado en otras investigaciones. Podemos observar que nuestro cultivo obtuvo las mayores ganancias de peso tanto en el grupo control como en el B2, respecto al resto de investigaciones reportadas hasta ahora en la literatura. Además, fue el único en reportar que su dieta experimental duplicó en valor de peso ganado al grupo control.

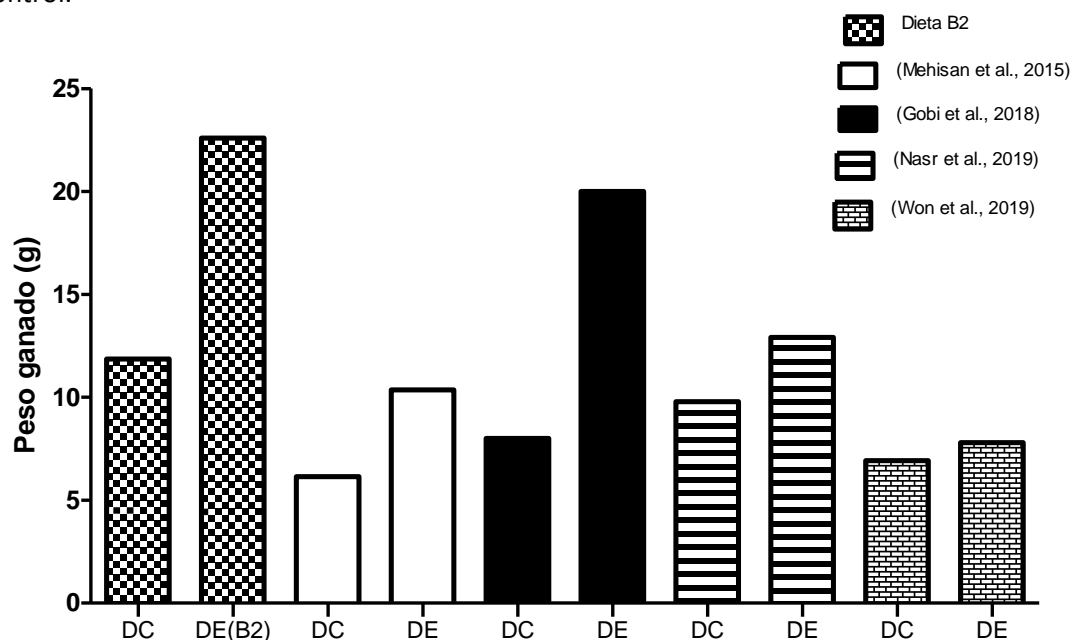


Figura 13. Comparación del peso ganado(g) en la especie Tilapia del Nilo alimentada con dieta control (DC) y dieta experimental (DE) B2 respecto a otras investigaciones.

Tabla 10. Peso ganado (g) en Tilapia del Nilo alimentada con dieta control (DC) y dieta experimental (DE)

Grupo	Dieta B2		(Mehisan et al., 2015)		(Gobi et al., 2018)		(Naser et al., 2019)		(Won et al., 2020)	
	DC	DE(B2) <i>B. subtilis</i>	DC	DE <i>B. coagulans</i>	DC	DE <i>B. licheniformis</i>	DC	DE <i>B. amyloliquefaciens</i>	DC	DE <i>B. subtilis</i>
PG	11.861 ± 1.741	22.599 ± 1.44	6.14 ± 0.20	10.36 ± 0.200	8	20	9.78 ± 0.33	12.91 ± 0.75	6.92 ± 0.078	7.8 ± 0.078

Anexo C

Los datos corresponden a la comparación de la composición proximal de nuestra dieta basal formulada para la especie Tilapia del Nilo y su contenido (%) de los ingredientes proteicos principales contra las dietas basales reportadas en la literatura. Se puede observar que nuestra dieta es alta en carbohidratos, los cuáles provienen de fuentes vegetales como la harina de soya. Además, la harina de soya es la principal fuente de proteínas en nuestra investigación, sustituyendo en gran cantidad a la harina de pescado.

Tabla 10. Comparativa de la composición proximal de la dieta basal de Tilapia del Nilo.

	Dieta B2	(Mehisan et al., 2015)	(Gobi et al., 2018)	(Naser et al., 2019)	(Won et al., 2020)
Proteínas	36%	36%	55%	31%	37%
Lípidos	11%	20%	10%	5.50%	6%
Carbohidratos	50%	44%	35%	45%	41%
Otros	3%	---	---	3%	16%

Tabla 11. Comparación de la cantidad (%) de los ingredientes proteicos en la dieta basal de Tilapia

	Dieta B2	(Mehisan et al., 2015)	(Gobi et al., 2018)	(Naser et al., 2019)	(Won et al., 2020)
Harina de pescado	10%	16%	28%	18%	17%
Harina de soya	40%	32%	49%	16%	31.50%
Otros	---	14% Harina de subproductos avícolas	---	---	5% Harina de sangre