

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

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**

Desarrollo de alimentos funcionales para tilapia roja, línea Pargo-UNAM (*Oreochromis spp.*) en agua de mar, utilizando probióticos del género *Bacillus*: Evaluación del desempeño biológico y enfrentamiento a *Aeromonas hydrophila*

Tesis

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

Presenta

Helena González Vila

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Helena González Vila

y aprobada por el siguiente Comité

M.C. Manuel de Jesús Acosta Ruíz
Director de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Dr. Jorge Olmos Soto



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

Dra. Ana Denise Re-Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen del Tesis que presenta **Helena González Vila** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida

Desarrollo de alimentos funcionales para tilapia roja, línea Pargo-UNAM (*Oreochromis spp.*) en agua de mar, utilizando probióticos del género *Bacillus*: Evaluación del desempeño biológico y enfrentamiento a *Aeromonas hydrophila*

Resumen aprobado por:

M.C. Manuel de Jesús Acosta Ruíz
Director de tesis

El presente estudio evaluó el efecto de dietas enriquecidas con probióticos del género *Bacillus* en el desempeño biológico, la digestibilidad y la resistencia al patógeno *Aeromonas hydrophila* en tilapia roja, línea Pargo-UNAM (*Oreochromis spp.*), cultivada en agua de mar. Se probaron tres dietas experimentales, suplementadas con diferentes cepas de *Bacillus* (*B. subtilis 9b*, *B. velezensis B2* y *B. velezensis V3*), además de un control sin probióticos. Los resultados indicaron que la dieta R3, enriquecida con *B. velezensis V3*, logró el mejor desempeño biológico en términos de crecimiento, supervivencia y eficiencia de conversión alimenticia. Aunque no se observaron diferencias significativas en la digestibilidad entre tratamientos, los datos sugieren que la dieta base poseía una alta digestibilidad, lo que podría haber minimizado el impacto de los probióticos en este parámetro. En cuanto a la resistencia al patógeno, la dieta R3 mostró la mayor tasa de supervivencia, destacando su eficacia en la protección contra infecciones. Además, esta dieta demostró ser la opción más costo-eficiente, combinando altos rendimientos biológicos con beneficios económicos.

Palabras clave: Tilapia, probiótico, *Bacillus*, ingredientes funcionales, *Aeromonas hydrophila*

Abstract of the thesis presented by **Helena González Vila** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science

Development of functional foods for red tilapia, Pargo-UNAM (*Oreochromis spp.*), using probiotics of the genus *Bacillus*: Evaluation of biological performance and resistance to *Aeromonas hydrophila*

Abstract approved by:

M.C. Manuel de Jesús Acosta Ruíz
Thesis Director

This study evaluated the effect of diets enriched with probiotics of the *Bacillus* genus on the biological performance, digestibility, and resistance to the pathogen *Aeromonas hydrophila* in red tilapia, Pargo-UNAM strain (*Oreochromis spp.*), cultured in seawater. Three experimental diets were tested, each supplemented with different *Bacillus* strains (*B. subtilis* 9b, *B. velezensis* B2, and *B. velezensis* V3), along with a control diet without probiotics. The results indicated that the R3 diet, enriched with *B. velezensis* V3, achieved the best overall biological performance in terms of growth, survival, and feed conversion efficiency. Although no significant differences were observed in digestibility among treatments, the data suggest that the base diet had high digestibility, which may have limited the impact of the probiotics in this parameter. Regarding pathogen resistance, the R3 diet recorded the highest survival rate, highlighting its effectiveness in protecting against infections. Additionally, this diet proved to be the most cost-efficient option, combining high biological performance with economic benefits.

Keywords: Tilapia, probiotic, *Bacillus*, functional feeds, *Aeromonas hydrophila*

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, en México (CICESE) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y su apoyo para poder finalizarlos. También al SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación) por otorgarme el apoyo financiero que me permitió dedicarme de lleno a este trabajo de investigación.

A mi asesor, M.C. Manuel de Jesús Acosta, por haberme guiado en el camino. Su experiencia y apoyo fueron clave para el desarrollo del proyecto y mi estancia en Ensenada.

A los miembros del comité el Dr. Jorge Olmos Soto y el Dr. Benjamín Barón Sevilla por su tiempo, sus valiosas observaciones y comentarios que enriquecieron el contenido y la calidad de esta tesis.

A los técnicos del departamento de Biotecnología Marina: a la M.C. Rosalía Contreras Flores por sus aportaciones y enseñanzas en el laboratorio de Biotecnología y Genómica de Organismos Acuáticos, y al Ing. Juan Ernesto Lerma Vargas, por su invaluable ayuda en el montaje y mantenimiento del sistema experimental. Y al Dr. Víctor Mercado por su amistad y ayuda en múltiples partes del proyecto.

Al Dr. Juan Pablo Lazo Corbera por permitirme usar el laboratorio de nutrición acuícola, y al técnico M.C. Abelardo Campos Espinoza por su orientación en el laboratorio de nutrición y ayuda en los análisis. A la M.C. Yanet Guerrero Rentería y al Dr. Diego Luis Delgado Álvarez, gracias por su valiosa colaboración y apoyo técnico.

A mi familia, que a pesar de estar a un océano de distancia, siempre ha estado presente con su amor y apoyo incondicional. Sin vosotros, este logro no habría sido posible.

Finalmente, a mis amigas y amigos y a todas las personas que me han acompañado en esta travesía, que me han hecho sentir en casa y que la familia también se puede elegir. Les agradezco por los momentos inolvidables y por acompañarme en los momentos más difíciles. Este trabajo también es fruto de su compañía y confianza.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	viii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	6
1.2 Justificación.....	7
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos.....	8
1.4.1 Objetivo general.....	8
1.4.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología.....	10
2.1 Diseño experimental y condiciones del cultivo.....	10
2.2 Formulación de la dieta.....	11
2.3 Experimento y desempeño biológico.....	11
2.4 Digestibilidad aparente.....	12
2.5 Enfrentamiento a <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675.....	13
2.6 Cálculo de índice costo-eficiencia de las dietas.....	14
2.7 Análisis estadístico.....	15
Capítulo 3. Resultados.....	16
3.1 Análisis proximal de las dietas.....	16
3.2 Desempeño biológico de la Tilapia roja.....	16

3.3	Enfrentamiento a <i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675	19
3.4	Costo-Eficiencia de los Tratamientos	20
Capítulo 4.	Discusión	22
Capítulo 5.	Conclusión	27
Capítulo 6.	Líneas Futuras de investigación y Recomendaciones	28
Literatura citada		29

Lista de figuras

Figura	Página
Gráfico de barras de Peso ganado (g) por individuo, tasa de crecimiento específico (SGR), factor de conversión alimenticia (FCR) y el alimento consumido (g/biomasa).....	18
Mortalidad acumulada (%) por tratamiento. R1 32%, R2 25%, R3 18.52% y DC 52.17%.	19

Lista de tablas

Tabla	Página
Composición proximal de las dietas en g/100g. La formulación está sujeta a protección intelectual.	11
Análisis proximal de las dietas en peso seco.....	16
Desempeño biológico de juveniles de Tilapia roja alimentadas con diferentes dietas experimentales.	17
Análisis proximal de músculo de Tilapia roja.	19
Costo-Eficiencia de los Tratamientos.	20
Comparación entre enfrentamientos a patógenos típicos de cultivo de tilapia. Orden descendente de supervivencia.....	24

Capítulo 1. Introducción

La pesca y la acuicultura siempre han tenido un objetivo común, proveer alimento de origen marino al ser humano. Cabe puntualizar, que el producto animal que se obtiene con estas prácticas productivas es de las proteínas de mejor calidad, de fácil digestión y que contienen aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Además, algunas especies también pueden proporcionar ácidos grasos esenciales (Asociación Empresarial de Acuicultura de España [APROMAR], 2022; Vázquez-Vera et al. 2022). Es decir, son alimentos que ayudan a la población a tener una dieta más sana y equilibrada (APROMAR, 2022).

La pesquería a nivel mundial lleva alrededor de 30 años en una situación de estabilidad, y esto se debe a que ya ha llegado a su máxima capacidad de explotación sostenible. Por otro lado, desde la década de los años 80 la producción acuícola continua con un crecimiento de la producción y sigue desarrollándose hoy en día. En conjunto, estas dos industrias produjeron 185 millones de toneladas en 2022, de las cuales el 51% proviene de la acuicultura y el 49% de la pesca (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2024).

En 2018, México registró una producción de 1.7 millones de toneladas de pescado (incluyendo moluscos y crustáceos), valorada en 2799.7 millones de USD. Donde el 29% provino de la acuicultura y el 71% de la pesca (Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD], 2021). Por lo que si se compara el sector nacional acuícola-pesquero con el mundial, se puede observar que la acuicultura del país aún se encuentra en un desarrollo prematuro, que si sigue la tenencia internacional seguirá creciendo con el tiempo.

El aumento de la población y consecuentemente la necesidad de alimentarla, ha dado al sector acuícola una gran oportunidad de crecimiento (APROMAR, 2022). Pero al mismo tiempo, la acuicultura ha tenido que enfrentarse a grandes desafíos ambientales a medida que se intensificaron los cultivos. Su rápido crecimiento ha sido posible gracias al desarrollo de distintos factores, entre ellos: la selección genética, la implementación de alimentos formulados, la bioseguridad y el control de enfermedades, además de la innovación digital y los avances comerciales en inversión y comercio (FAO, 2020).

Los productos de la pesca son los ingredientes principales para la producción de las proteínas y los lípidos que se usan para la elaboración de dietas formuladas (Tacón et al., 2006). Los peces pelágicos menores son los más utilizados para la producción de harina y aceite de pescado (Perón et al., 2010). Sin embargo,

también se emplean organismos de niveles superiores en la cadena trófica. Este uso intensivo de ambos grupos de peces puede llevar a un desequilibrio en el ecosistema y exponerlos a la sobrepesca (Klinger & Naylor, 2012; Ardura et al., 2011). El motivo por el que tradicionalmente se ha hecho uso de la materia prima de la pesca, es su contenido de aminoácidos y ácidos grasos esenciales necesarios para un crecimiento, desarrollo y una reproducción eficiente (Glencross, 2009; Li et al. 2021; Furuya, 2023). A causa de esto, ha habido un incremento en la demanda de harinas y aceites de pescado, seguido de un aumento de precios ya que se trata de un recurso limitado (Perón et al., 2010; FAO, 2022). En consecuencia, el sector de la acuicultura se ha visto obligado a buscar fuentes alternativas más sostenibles y económicas para la formulación de las dietas (Ardura et al., 2011; FAO, 2022). Las nuevas fuentes de proteína y ácidos grasos se han explorado por muchos años. Se han usado los productos de la pesca incidental, subproductos de origen ganadero y harinas de origen vegetal entre otros (Robaina, 1998). Y han sido estos últimos los que han ganado más popularidad debido a su gran disponibilidad y sus bajos precios (Olmos et al., 2022). Sin embargo, tanto los crustáceos como los peces no tienen las enzimas necesarias para digerir por completo carbohidratos y lípidos complejos (Olmos & Paniagua, 2014) como los existentes en los vegetales, lo que lleva a un aprovechamiento deficiente del alimento (Olmos et al., 2020) y consecuentemente un menor crecimiento de los organismos cultivados.

Otro problema actual que enfrenta la acuicultura con organismos dulceacuícolas es el uso del agua, a pesar de su importancia en la producción de alimentos, la acuicultura está creciendo rápidamente, sin embargo, carece de regulaciones específicas que aborden sus necesidades de uso del agua dulce en México (Ruelas et al., 2020). En este contexto, el cultivo de tilapia en agua salada ha surgido como una alternativa viable a la acuicultura tradicional en agua dulce, especialmente en regiones donde los recursos de agua dulce son limitados (Lingyuan et al., 2021). La tilapia roja Pargo-UNAM, población sintética proveniente de tres grupos genéticos de tilapia, tiene un desarrollo adecuado en condiciones de agua salobre y marina sin impactos negativos significativos, característica heredada de la tilapia roja de Florida (Muñoz-Córdova, 2020). Por esta razón, su cultivo en agua salada podría representar una opción prometedora para diversificar la acuicultura en México, optimizando el uso de los recursos hídricos disponibles y contribuyendo a la sostenibilidad del sector.

Aunque el cultivo de tilapia esté progresando adecuadamente y de manera muy rápida, el sector se enfrenta a diversos desafíos, en particular en lo que respecta al crecimiento, salud y mortalidad (Nicholson et al., 2020). Estos retos, aunados al estrés ocasionado a los peces por distintos factores como, mala calidad del agua, factores ambientales inadecuados, altas densidades, etc., puede causar

inmunodepresión, facilitando así el desarrollo de enfermedades (Janda and Abbott, 2010; Rodrigues et al., 2019).

Actualmente se han notificado distintas enfermedades bacterianas que son más propensas a aparecer en organismos de aguas templadas. Incluyendo infecciones por *Aeromonas* (Nicholson et al., 2020; Pauzi et al., 2020), *Edwardsiella* (Nhin et al., 2022), *Flavobacterium* (Nhin et al., 2023), *Staphylococcus*, *Providencia* (Rajme-Manzur et al., 2023), *Francisella* (Soto et al., 2009), *Streptococcus* (Basri et al., 2020) y *Vibrio* (Sumithra et al., 2019), lo que a menudo conduce a altas tasas de mortalidad.

Uno de los patógenos comúnmente encontrados en cultivos de tilapia es *Aeromonas hydrophila*, se trata de un cocobacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo y con motilidad. Está presente en el agua y en el tracto digestivo de algunos animales, aunque en ocasiones puede llegar a enfermar a peces y mamíferos, causando grandes mortalidades y por ende pérdidas económicas (Rodríguez et al., 2005). Una de las enfermedades desencadenadas por estas bacterias es la septicemia por *Aeromonas* móviles (MAS), y puede desarrollarse de dos maneras: de forma aguda, induce a hemorragias internas y bacteriemia general, sin mostrar síntomas externos, aunque los organismos afectados pueden mostrar nado errático. Y la forma crónica, en la cual aparecen úlceras cutáneas y necrosis en la musculatura (Derome et al., 2016; Cavalcante et al., 2020).

Hasta el día de hoy, los antibióticos han sido la principal herramienta para controlar las infecciones bacterianas en la acuicultura, como el MAS. No obstante, su uso ha suscitado preocupación debido al riesgo de generar bacterias resistentes, lo que disminuye la efectividad de los tratamientos. A su vez, la acumulación de estos fármacos en los peces y en el entorno puede representar un peligro tanto para los consumidores como para el medio ambiente (Pachanawan et al., 2008). Para evitar estos problemas, ha surgido una tendencia a desarrollar métodos alternativos para controlar y, sobre todo, prevenir las infecciones bacterianas en la acuicultura. Entre estos métodos destacan las medidas de biocontrol (Defoirdt et al., 2007; Pachanawan et al., 2008), y uno de los enfoques que ha demostrado ser muy efectivo es la nutrición, que permite disminuir los problemas de manera integral. En este contexto, la acuicultura tiene como objetivo maximizar el crecimiento y la supervivencia de los organismos al menor costo (Knights, 1985; Robaina, 1998), cubriendo todas sus necesidades metabólicas y fisiológicas. Para enfrentar estos desafíos, se ha estado investigado el uso de Ingredientes Funcionales en las dietas (Robaina, 1998), definidos por el North America Technical Committee on Food Components for Health Promotion (ILSI) en 1999, citado por Peso-Echarri et al. (2012), como aquellos que tienen un efecto positivo sobre una o varias

funciones en un organismo y son fundamentales para el crecimiento, el control de enfermedades y la mejora de la salud.

Las industrias de producción animal llevan alrededor de medio siglo incorporando microorganismos vivos como componentes de las dietas (Vázquez, 2016) convirtiéndolos en ingredientes funcionales. Estos suplementos, llamados probióticos, se definen como microorganismos vivos que suministrados en concentraciones adecuadas otorgan un beneficio para la salud del huésped (FAO/ World Health Organization [WHO], 2006). Para que un microorganismo sea considerado un probiótico en la acuicultura, debe cumplir con varias características clave. En primer lugar, no debe causar daño al huésped y debe ser aceptado por el organismo a través de la ingestión, colonización y posterior reproducción en el hospedador. Además, debe ser capaz de llegar a los órganos donde ejercerá su efecto beneficioso (Pérez-Chabela et al., 2020), sin degradar la mucosa intestinal, ni ofrecer resistencia a virus, ni portar genes transferibles de resistencia a antibióticos. Para ser eficaces, deben sobrevivir el tránsito por el tracto gastrointestinal, siendo tolerantes tanto al ácido gástrico como a la bilis, y ser capaces de adherirse a las mucosas y colonizar temporalmente el intestino (Borchers et al., 2009). Un aspecto fundamental es su capacidad de inhibir patógenos, lo que se debe evaluar mediante pruebas in vitro (Borchers et al., 2009; Pérez-Chabela et al., 2020). Asimismo, es esencial que se analice su seguridad y se descarte cualquier riesgo de patogenicidad en los organismos que lo hospedan (Pérez-Chabela et al., 2020). Finalmente, su estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento es crucial para garantizar su viabilidad y efectividad (Borchers et al., 2009).

Actualmente, las bacterias del género *Bacillus* están siendo un foco de la investigación debido a su uso como probióticos en animales (Olmos et al., 2015). Las especies de *Bacillus* son bacterias Gram-positivas, formadoras de esporas y con bajo contenido de Guanina y Citosina (Nayak, 2021), además, son uno de los organismos más extendidos en la naturaleza pudiendo habitar en el suelo, el agua y el aire (Sonnenschein et al., 1993; Olmos & Paniagua, 2014). Esta versatilidad viene dada por su metabolismo facultativo (aerobia/anaerobias) (Nayak, 2021). Algunas de las especies de este género se han clasificado como GRAS (Generally Recognized by Safe) por la Food and Drug Administration (FDA) (2020), es decir, que su consumo es seguro tanto para animales como humanos.

Los probióticos, como los del género *Bacillus* se han aplicado y probado en una variedad de contextos, tales como promotor del crecimiento, inhibidor de patógenos, mejorador de la digestibilidad de nutrientes, optimizador de la calidad del agua, promotor de la tolerancia al estrés y facilitador del desempeño reproductivo (Martínez-Cruz et al., 2012).

En referencia a la mejora de la digestión del hospedador, la capacidad de las bacterias se explica por la producción de una serie de enzimas extracelulares como la amilasa, proteasa, lipasa y celulasa que tienen la capacidad de degradar eficazmente proteínas, carbohidratos y lípidos complejos (Ray et al., 2012). Esto ayuda al hospedador a tener una mejor digestión y asimilación del alimento, y consecuentemente una mayor eficiencia en la tasa de conversión alimenticia (Wang & Xu, 2006; López et al., 2014). Es decir, con la introducción de estos probióticos a la dieta se puede conseguir que al hacer mayor uso de productos de origen vegetal se tenga un mayor crecimiento y peso, así como una reducción de costos de las dietas (Olmos et al., 2020).

Por otro lado, los probióticos tienen la capacidad de inhibir a los patógenos a través de dos mecanismos principales: la exclusión competitiva y la liberación de sustancias en el intestino del hospedador (Balcázar et al., 2006; Martínez-Cruz et al., 2012). La exclusión competitiva se da cuando un microorganismo benéfico o neutral coloniza al hospedador, reduciendo o impidiendo la entrada de patógenos oportunistas mediante el antagonismo bacteriano (Balcázar et al., 2006). Además, los probióticos liberan sustancias bactericidas o bacteriostáticas al intestino del hospedador, inhibiendo la proliferación de patógenos. Estas sustancias pueden ser antibióticos, bacteriocinas, sideróforos, diversas enzimas (como lisozimas y proteasas) y peróxido de hidrógeno, así como a la modificación del pH intestinal mediante la generación de ácidos orgánicos (Martínez-Cruz et al., 2012).

La microbiota intestinal, además de actuar directamente sobre los patógenos, cumple una función crucial en el sistema inmunológico del hospedador, modulando la maduración del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y reforzando la barrera de defensa contra diversos microorganismos (Pérez-Chabela et al., 2010). En los peces, en particular, la superficie de la mucosa intestinal constituye una primera línea de defensa clave contra la invasión de patógenos, contribuyendo tanto a la salud del hospedador como a la eficacia de los probióticos (Cavalcante et al., 2020).

Tomando en consideración todos los desafíos que actualmente enfrentan los cultivos de tilapia, el propósito de este proyecto es conseguir un mejor desempeño biológico de los juveniles del Pargo-UNAM (*Oreochromis spp.*) en agua de mar, mediante su alimentación con dietas adicionadas con probióticos del género *Bacillus*. De tal manera que con una buena nutrición y la actividad probiótica se obtengan un mayor crecimiento, salud y la protección contra el patógeno *Aeromonas hydrophila*, consiguiendo así que disminuyan las tasas de mortalidad ocasionadas por las enfermedades que provocan estos patógenos.

1.1 Antecedentes

La tilapia se ha convertido en el segundo animal acuático más cultivado en el mundo, alcanzando en el 2018 el 5.27% de la producción acuícola mundial (Miao et al., 2020). Pero el término “tilapia” es en realidad un nombre común concedido a tres géneros distintos de la familia Cichlidae: *Oreochromis*, *Sarotherodon* y *Tilapia*. Estos géneros comprenden a un grupo de peces nativos de África y de Oriente Medio (Fitzsimmons, 2000), que por su gran tolerancia a distintos ambientes y condiciones se han introducido en los ambientes dulceacuícolas de todos los continentes (Watanabe et al. 2002). Entre las capacidades a destacar de estos ciclidos, Watanabe y colaboradores (1997) describieron una gran tolerancia a bajos niveles de oxígeno disuelto (1ppm), a concentraciones de amonio de 2.4 a 3.4 mg/L y rangos de pH ácidos (pH 5) hasta alcalinos (pH 11). Además, algunas variedades tienen la capacidad de soportar tanto agua dulce como salada. La tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, es la “tilapia” más popular en el mercado (Ramírez-Paredes et al., 2012; Miao et al., 2020). Esta especie se valora porque tiene un filete firme, blanco y con pocas espinas, con bajo contenido de grasas y con ligero sabor a pescado (Garduño-Lugo et al., 2003; Ramírez-Paredes et al., 2012). Con la intención de mejorar aún más las características de esta especie, se desarrolló el híbrido Pargo-UNAM, compuesto por tres grupos genéticos: tilapia roja de Florida (50 %), tilapia rosa del Nilo (25 %) y tilapia Rocky Mountain (25 %) (Muñoz-Córdoba, 2020). Este híbrido fue creado con el objetivo de obtener una tilapia de coloración rojiza, que resulta más atractiva para el mercado, y con una capacidad de crecimiento igual o superior a la tilapia del Nilo (Ramírez-Paredes et al., 2012; Muñoz-Córdoba, 2020).

Los probióticos del género *Bacillus spp.* han mostrado resultados prometedores en dietas acuícolas, beneficiando la salud y el crecimiento de los organismos en cultivo. Estudios previos han evaluado su efectividad en peces omnívoros como la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Aly et al., 2008; Macías et al., 2024), la tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) (Gobi et al., 2018) y la carpa hindú (*Labeo rohita*) (Bairagi et al., 2004), así como en especies carnívoras como la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Olmos et al., 2022), la corvina blanca (*Atractoscion nobilis*) (López et al., 2016) y la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (Peggs, 2015). Asimismo, se ha demostrado su eficacia en crustáceos de gran importancia comercial, como el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Shen et al., 2010).

Actualmente, la prevención de enfermedades en acuicultura se enfoca en reducir el uso de antibióticos, debido a sus efectos negativos a largo plazo (Pachanawan et al., 2008), y en promover alternativas como los probióticos, que han demostrado una mejora en la respuesta inmunológica del hospedador (Balcázar

et al., 2006; Martínez-Cruz et al., 2012). En cultivos de tilapia, uno de los patógenos de mayor preocupación es *Aeromonas hydrophila*, una bacteria que puede causar infecciones graves, afectando la supervivencia y salud de los peces (Rodríguez et al., 2005; Cavalcante et al., 2020).

A. hydrophila es conocida por su virulencia, la cual está directamente relacionada con diversos factores que dañan los tejidos del hospedador y pueden causar altas tasas de mortalidad en tilapias (Rodríguez et al., 2005). Según El-Bahr et al. (2019), la patogenicidad de esta bacteria depende de la presencia y expresión de genes virulentos, que codifican productos extracelulares (PEC) y otros factores asociados a la superficie y al interior de las células bacterianas. Estos elementos incluyen plásmidos y sistemas de restricción/modificación, cuya relevancia exacta en la patogénesis aún no se ha esclarecido del todo (Thune et al., 1993).

Los PEC de *A. hydrophila* comprenden una variedad de proteínas extracelulares que contribuyen al daño en los tejidos del hospedador. Entre los PEC más destacados se encuentran la alfa y beta hemolisina, que induce hemólisis mediante la destrucción de glóbulos rojos, causando anemia (El-Bahr et al., 2019). Además, *A. hydrophila* secreta varias proteasas, como la metaloproteasa termoestable (MPTE) y las serinas proteasas termoestables y termolábiles, las cuales dañan los tejidos musculares de los peces, particularmente cuando se inyectan por vía intraperitoneal, provocando lesiones extensas (Rodríguez et al., 2005).

Otros PEC incluyen lipasas, amilasas, sideróforos, quitinasas y enterotoxinas citotóxicas y citotónicas, que no solo ayudan a la invasión bacteriana sino que también modulan el ambiente intestinal en favor de *A. hydrophila*. Por ejemplo, la aerolisina es una toxina formadora de poros que causa lisis celular y aumenta la permeabilidad celular, lo que contribuye a una respuesta inflamatoria severa en los tejidos del hospedador (de Guia et al., 2024). Este conjunto de proteínas y enzimas extracelulares de *A. hydrophila* subraya la complejidad de los mecanismos patogénicos de esta bacteria, destacando la necesidad de estrategias de prevención eficaces, como el uso de probióticos, para reducir la incidencia de infecciones en cultivos de tilapia.

1.2 Justificación

El uso de probióticos como ingredientes funcionales en la acuicultura no solo fortalece el sistema inmunológico de los organismos, promoviendo un mayor crecimiento y supervivencia, sino que también

aporta beneficios económicos al reducir la necesidad de ingredientes de origen animal en las dietas. La complejidad de los factores patogénicos de *A. hydrophila*, como sus toxinas y enzimas que causan daño en los tejidos, resalta la importancia de estrategias preventivas eficaces. En este contexto, los probióticos del género *Bacillus spp.* son una herramienta prometedora, ya que además de su acción antimicrobiana contra patógenos, optimizan la asimilación de nutrientes y fortalecen la respuesta inmune. Esto no solo reduce las infecciones, sino que mejora el crecimiento, la eficiencia alimenticia y la calidad de los peces, promoviendo así un sistema de cultivo más saludable y sostenible.

1.3 Hipótesis

La utilización de una de las cepas del probiótico *Bacillus spp.* en juveniles de Tilapia roja de la línea Pargo-UNAM (*Oreochromis spp.*) cultivada en agua de mar, promueve una mejor asimilación de la dieta provocando una mayor supervivencia, Tasa de Crecimiento Específico (SGR) y una menor Tasa de Conversión Alimenticia (FCR). Además, le proporcionará protección contra el patógeno *Aeromonas hydrophila* evitando altas mortalidades.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de cepas probióticas de *Bacillus spp.* en dietas para juveniles de tilapia roja (línea Pargo-UNAM, *Oreochromis spp.*), cultivadas en agua de mar, analizando su impacto en el perfil fisiológico-nutricional y la supervivencia de los peces frente al patógeno *Aeromonas hydrophila*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el desempeño biológico y los parámetros de crecimiento para cada tratamiento, mediante la supervivencia (%), el Factor de Crecimiento Específico (FCE), el Factor de Conversión Alimenticia (FCR), la Tasa de Eficiencia Proteica (TER), Tasa de crecimiento relativo (TCR), el Índice Hepatosomático (IHS) y el Índice Viscerosomático (IVS).

- Conocer la composición proximal de la dieta y del filete del organismo.
- Evaluar la digestibilidad aparente de las dietas.
- Evaluar el efecto protector del probiótico contra una infección de *Aeromonas hydrophila*.
- Evaluar la relación costo-eficiencia de las dietas experimentales y estimar las pérdidas económicas derivadas de la mortalidad causada por *Aeromonas hydrophila*, comparando la ganancia de biomasa que resulta con y sin exposición al patógeno.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Diseño experimental y condiciones del cultivo

El experimento se realizó en el Sistema de Ambiente Controlado del departamento de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). Los organismos juveniles de Tilapia roja (*Oreochromis* sp.) fueron proporcionados por el departamento de Microbiología del CICESE, Ensenada, Baja California. Los peces aclimatados al agua dulce se depositaron en un tanque de recepción de 2000 L. En el periodo de aclimatación a las condiciones del laboratorio se les suministró alimento comercial *Nogafish*.

El experimento se realizó en agua de mar, por lo que se hicieron 2 ensayos previos de cambio de salinidad (5 organismos por estanque) a 3 ‰ y 5 ‰ al día. Al no haber diferencias aparentes entre los tratamientos se procedió a aumentar la salinidad a una tasa de 5 PSU por día en el tanque de recepción con todos los organismos y a los 6 días ya estaban aclimatados a 34 PSU de salinidad.

Pasados 8 días, inició el experimento y los animales fueron distribuidos en 12 estanques de 200 litros cada uno. Se asignaron 4 grupos de tres estanques con agua de mar. Cada estanque contenía 12 organismos con un peso promedio de 5.3 g. Se usó un sistema de recirculación (semicerrado), donde las descargas de agua de cada grupo experimental fueron tratadas con un biofiltro y reintegradas a los estanques. Diariamente se remplazó el 30% del volumen de los estanques con agua limpia. Todos los estanques estaban provistos de aireación en forma continua.

El estudio consistió en 3 dietas experimentales y un control, tuvo una duración de 8 semanas. El sistema se mantuvo a una salinidad de 34 ± 1.2 ‰ y una temperatura media de los tratamientos fue: $23.9 \pm 9.5^{\circ}\text{C}$ (R1), $22.7 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ (R2), $23 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ (R3) y 22.8 ± 1.4 °C (DC), sin diferencias significativas (prueba no paramétrica). Los parámetros del agua se monitorearon a diario, se utilizó una sonda multiparamétrica para medir la Temperatura (°C), Salinidad (‰), pH y Oxígeno disuelto (mg/L). Por otra parte, se utilizaron los kits API para agua salada para medir el Nitrógeno amoniacal total ($\text{NAT-NH}_3+\text{NH}_4^+$), Nitritos (NO_2) y Nitratos (NO_3).

2.2 Formulación de la dieta

Se formuló una dieta control (DC) con 36% de proteína y 7% de lípidos. Con esa misma dieta base se hicieron tres formulaciones con probióticos a una concentración de 0.1 g/100g, cada uno de ellos contuvo una cepa distinta del género *Bacillus* (Tabla 1). Todos los ingredientes se mezclaron en un equipo “Kitchen Aid” de 5.0 L de capacidad. Posteriormente la mezcla húmeda se introdujo en un molino, donde se obtuvieron pellets de 1.5 a 2 mm de diámetro. El alimento se secó a 65°C por 3 horas y a continuación, con la ayuda de un ventilador, se aireó a temperatura ambiente por 12 horas. El alimento seco se colocó en bolsas de polietileno etiquetadas y se almacenó en un lugar fresco.

Tabla 1. Composición proximal de las dietas en g/100g. La formulación está sujeta a protección intelectual.

Ingredientes	R1 <i>B. subtilis 9b</i>	R2 <i>B. velezensis B2</i>	R3 <i>B. velezensis V3</i>	DC
Harina de pescado	15%	15%	15%	15%
Harina de soya	46%	46%	46%	46%
Probiótico	0%	1%	1%	1%
Harina de trigo	Se omiten porcentajes			
Harina de maíz				
Maicena				
Aceite de canola				
Lecitina de soya				
Grenetina				
Otros ingredientes				
Proteína total	36%	36%	36%	36%
Lípidos totales	7%	7%	7%	7%

2.3 Experimento y desempeño biológico

El experimento tuvo una duración de 8 semanas. Se hicieron 2 biometrías, una inicial (25 animales por cada estanque) y una final. Para reducir el estrés asociado a la manipulación, los peces se anestesiaron en una cubeta de agua con una solución de aceite de clavo diluida en etanol (1:9). Se cuantificó la

supervivencia (%), la Tasa de Crecimiento Específico (SGR), el Factor de Conversión Alimenticia (FCR), la Tasa de Eficiencia Proteica (TEP), el Índice Hepatosomático (IHS) (%) e Índice Viscerosomático (IVS) (%).

Se utilizaron las siguientes fórmulas para calcular los parámetros mencionados anteriormente:

$$\text{Supervivencia (\%)} = 100 \times \frac{\text{No. org. final}}{\text{No. org. inicial}} \quad (1)$$

$$\text{SGR} = 100 \times \frac{\text{Ln(Peso final)} - \text{Ln(Peso inicial)} * 100}{t \text{ (días)}} \quad (2)$$

$$\text{FCR} = \frac{\text{Alimento suministrado (g)}}{\text{Peso ganado del Org. (g)}} \quad (3)$$

$$\text{TEP} = \frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}} \quad (4)$$

$$\text{IHS (\%)} = \frac{\text{Peso húmedo del hígado (g)}}{\text{Peso del Org. eviscerado (g)}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{IVS (\%)} = \frac{\text{Visceras (g)}}{\text{Peso del Org. (g)}} \times 100 \quad (6)$$

Donde:

No.Org. : número de organismos

t : tiempo (días)

Se hizo un análisis de la composición bioquímica proximal de las dietas y de los organismos. Se cuantificó el contenido de humedad (2 horas a 135°C) y de cenizas (4 horas a 550°C) por el método gravimétrico descrito en la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. Para cuantificar el porcentaje de proteína del músculo de los peces y el alimento se usó del método micro-Kjeldahl (1883) (AOAC, 1990). El contenido total de lípidos se cuantificó por extracción mediante Soxhlet, según las técnicas descritas por la AOAC (1990).

2.4 Digestibilidad aparente

La digestibilidad se analizó mediante el método de cenizas insolubles en ácido (CIA) descrito por Tejeda (1997) y modificado por Montañó-Vargas (2002). La recolección de las heces se hizo después de la

alimentación. Este proceso se realizó las veces necesarias hasta tener una cantidad suficiente de muestras para el análisis. Las heces y el alimento fueron almacenadas a -4º C hasta su análisis.

Para el análisis de CIA las muestras se secaron e incineraron siguiendo las pautas marcadas por la AOAC (1990). A continuación, se procedió a la preparación de los filtros y el tratamiento de las muestras con ácido y una vez digeridas, las cenizas insolubles en ácido quedaron en los filtros.

Los cálculos para obtener el porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (CIA) se hicieron con la siguiente formula:

$$CIA (\%) = 100 \times \frac{F_c - F_i}{P_m} \quad (7)$$

Pm: Peso muestra (g)

Fi: Peso inicial del filtro (g)

Ff: Peso del filtro más ceniza (g)

Después de obtener el porcentaje de CIA para las heces y el alimento se calculó el Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA):

$$CDA = 100 - \frac{CIA (\%) \text{ en dieta}}{CIA(\%) \text{ en heces}} \times 100 \quad (8)$$

2.5 Enfrentamiento a *Aeromonas hydrophila* CAIM675

Una vez transcurridos los dos meses del experimento de alimentación con los tratamientos se procedió iniciar una prueba de patogenicidad. La cepa de *Aeromonas hydrophila* CAIM675 se obtuvo del Laboratorio de Microbiología Molecular del departamento de Biotecnología Marina, CICESE.

Todos los peces fueron inoculados mediante una inyección intraperitoneal con 0.1 mL de *Aeromonas hydrophila* CAIM675 a una concentración de 4×10^6 CFU/ml, siguiendo la metodología de Abarike et al. (2018) y Kuebutornye et al. (2020). Esta concentración fue elegida duplicando la dosis que se administró en el trabajo de Macías et al. (2024). Durante los ocho días siguientes se hizo un seguimiento de los peces y de sus mortalidades y subsecuentemente se determinó la supervivencia con la formula descrita

anteriormente (6). Además, se calculó el nivel relativo de protección (NRP) descrito por Newman y Majnarich (1982).

$$NRP = 100 - \frac{\% \text{Mortalidad de los Tratamientos}}{\% \text{Mortalidad del Control}} \times 100 \quad (11)$$

2.6 Cálculo de índice costo-eficiencia de las dietas

Se calculó el índice costo-eficiencia de las dietas experimentales para juveniles de tilapia roja, utilizando el Costo Total del Alimento Consumido (CTA) y el Costo por Unidad de Biomasa (CUB) como indicadores del rendimiento económico.

Las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$CTA = \text{Consumo total de alimento (g)} \times \text{Costo de la dieta por g} \quad (12)$$

$$CUB = \frac{CTA}{\text{Ganancia de biomasa}} \quad (13)$$

Adicionalmente, con base en los resultados del enfrentamiento contra el patógeno se hizo una estimación de las posibles pérdidas económicas derivadas de una alta mortalidad causada por el patógeno *A. hydrophila* en los cultivos, mediante la comparación de la ganancia de biomasa en condiciones con y sin la presencia del patógeno. Para ello, se calculó la ganancia de biomasa considerando el porcentaje de supervivencia obtenido al finalizar el enfrentamiento con el patógeno, denominado "Pat-Ganancia de biomasa". A partir de esto, se obtuvo la diferencia entre la ganancia de biomasa sin el patógeno y con el patógeno:

$$Diferencia = \text{Ganancia de biomasa} - \text{Pat-Ganancia de biomasa} \quad (14)$$

Para calcular la pérdida del CUB debido al impacto del patógeno, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de CUB (MXN/Ton) por entrada patógeno} = Diferencia \times CUB \quad (15)$$

2.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó una prueba de ANOVA de un factor de efectos fijos, con diseño completamente aleatorizado, previamente comprobando los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (test de Levene). En los casos donde los factores probaron ser diferentes, se hizo una comparación post-hoc con el test de Tukey, para identificar los tratamientos que resultaron diferentes. Para aquellas variables en las que el ANOVA identificó diferencias significativas, pero que con la prueba de Tukey no se corroboraron, se utilizó la prueba de Duncan.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Análisis proximal de las dietas

El análisis proximal que se hizo de las dietas (Tabla 2) corroboró los porcentajes de la formulación teórica, con un ligero desvío en los lípidos, para los que se había calculado un 7% y se obtuvo alrededor de 1% menos.

Tabla 2. Análisis proximal de las dietas en peso seco.

	R1	R2	R3	DC
Proteína (%)	35.88 ± 0.81	36.69 ± 0.71	36.17 ± 0.57	36.87 ± 0.53
Lípidos (%)	5.87 ± 0.16	6.02 ± 0.11	5.70 ± 0.39	6.08 ± 0.16
Extracto libre de nitrógeno (%)	38.46 ± 1.11	37.00 ± 1.46	37.29 ± 0.68	37.47 ± 0.11
Humedad (%)	14.04 ± 0.19	14.05 ± 0.29	14.64 ± 0.21	13.49 ± 0.11
Cenizas (%)	6.29 ± 0.12	6.22 ± 0.01	6.19 ± 0.11	6.08 ± 0.33

Los valores representan el porcentaje promedio ± desviación estándar. Los superíndices con letras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada fila.

3.2 Desempeño biológico de la Tilapia roja

El experimento tuvo una duración de 58 días, y los resultados del desempeño biológico se presentan en la Tabla 3 y Figura 1. En cuanto al peso final y el peso ganado, el tratamiento R1 mostró valores inferiores en comparación con los demás, mientras que los tratamientos R3 y la dieta control (DC) obtuvieron las mayores ganancias de peso. Para la tasa de crecimiento específico (SGR), tanto la dieta control como el tratamiento R3 destacaron con los mejores resultados. Los resultados se presentan en su escala original para facilitar la interpretación. Sin embargo, las pruebas estadísticas se llevaron a cabo con los datos transformados a raíz cuadrada.

En términos de eficiencia alimenticia, las dietas con *B. velezensis* (B2 y V3) mostraron los mejores valores del Factor de Conversión Alimenticia (FCR), lo que indica una mayor eficiencia en el uso del alimento. Sin embargo, se observó que las tilapias del tratamiento R1 presentaron un comportamiento alimenticio

particular, ya que consumían el alimento únicamente cuando las partículas permanecían en la superficie del agua, pero no consumían las partículas que se precipitaban al fondo del estanque. Para mejorar el consumo del alimento, se optó por molerlo en partículas más finas. Este comportamiento pudo afectar la precisión en la estimación del consumo, por lo que es posible que se estimara en forma incorrecta el alimento consumido para este tratamiento.

Tabla 3. Desempeño biológico de juveniles de Tilapia roja alimentadas con diferentes dietas experimentales.

	R1 <i>B. subtilis 9b</i>	R2 <i>B. velezensis</i> B2	R3 <i>B. velezensis</i> V3	DC
Peso inicial (g)	5.1 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.4	5.2 ± 0.2
Peso final (g)	28.5 ^a ± 2.8	31.8 ^{ab} ± 7.2	39.3 ^b ± 1.18	39 ^b ± 4.9
Peso ganado (g)	23.4 ^a ± 2.6	26.4 ^{ab} ± 7	33.7 ^b ± 1.3	33.8 ^b ± 4.8
LT ¹ inicial (cm)	6.5 ± 0.2	6.6 ± 0.1	6.6 ± 0.2	6.5 ± 0.1
LT ¹ final (cm)	11.4 ± 0.5	11.6 ± 0.9	12.6 ± 0.1	12.5 ± 0.6
LT ¹ ganado (cm)	4.9 ± 0.4	5.0 ± 0.8	6.1 ± 0.1	6 ± 0.6
Alimento Consumido (g/biomasa)	43.1 ± 5.1	44.8 ± 1.6	46.4 ± 0.2	47.1 ± 3
Supervivencia ² (%)	86.1 ± 9.6	97.2 ± 4.8	100 ± 0	88.9 ± 9.6
SGR ³	0.5 ± 0	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1
FCR ⁴	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.5	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
TER ⁵	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.03	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.02
IHS ⁶	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.5	2 ± 0.5
IVS ⁷	14.7 ± 6	16.3 ± 3.4	15.5 ± 3.5	16.3 ± 1.1
CDA ⁸	74.2 ± 18.2	78.6 ± 15.4	71.6 ± 6.9	72.7 ± 22.3

Los valores representan el porcentaje promedio de n = 3 ± desviación estándar. Los superíndices con letras representan las diferencias significativas (p<0.05) para cada fila.

¹LT: Longitud Total

²Supervivencia (%) = 100 x (Org. Finales/Org. Iniciales)

³SGR: Tasa de Crecimiento Específico = (Ln(Peso final)-Ln(Peso inicial))*100/t(días)

⁴FCR: Factor de Conversión Alimenticia = Alimento suministrado (g) – Peso ganado (g)

⁵TER: Tasa de Eficiencia Proteica = (Peso ganado (g)/Proteína consumida (g)) x 100

⁶IHS: Índice Hepatosomático = (Peso húmedo del hígado (g)/Peso del org. eviscerado (g)) x 100

⁷IVS: Índice Viscerosomático = (Peso Org. (g)/ Peso vísceras (g)) x 100

⁸CDA: Coeficiente de Digestibilidad Aparente

En cuanto a la supervivencia, con el tratamiento R3 (*B. velezensis* V3) se logró un 100%, igualmente al no haber diferencias significativas entre los tratamientos todos mostraron alta supervivencia. Los valores del Índice Hepatosomático (IHS) e Índice Viscerosomático (IVS) fueron similares entre los tratamientos, con ligeros incrementos en el grupo control. Asimismo, los valores del Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA) también fueron similares entre las dietas, lo que sugiere que todas las formulaciones presentaron una digestibilidad comparable.

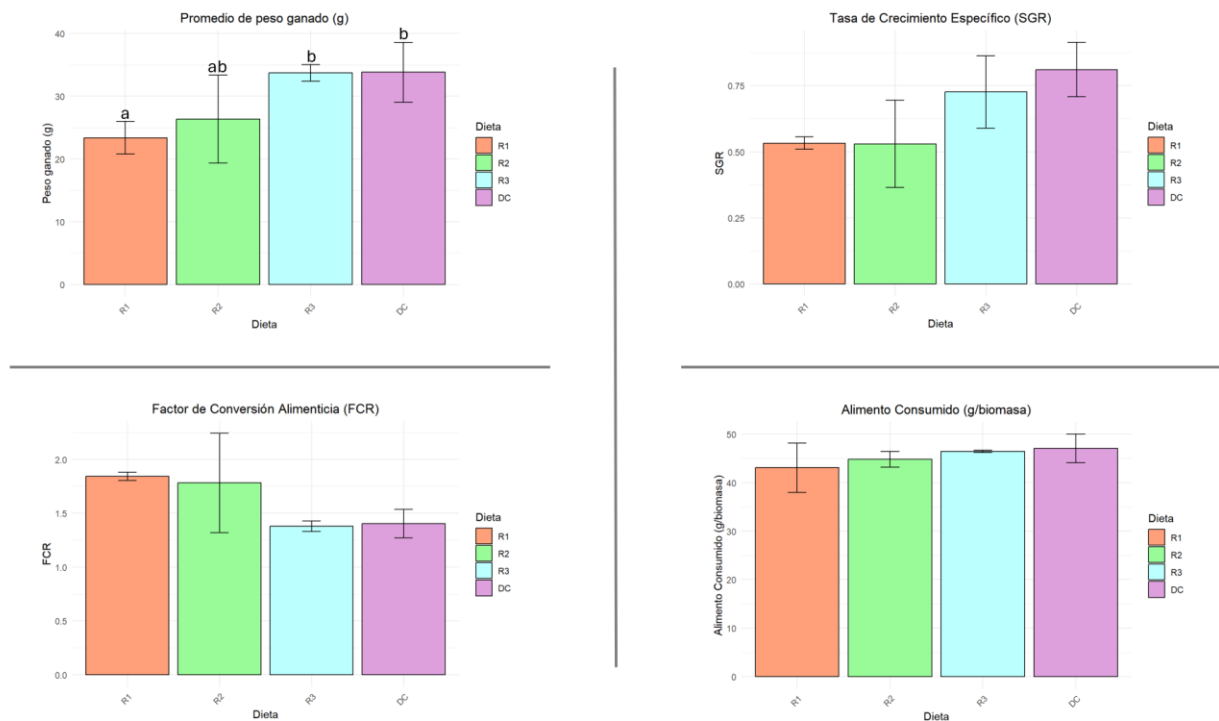


Figura 1. Gráfico de barras de Peso ganado (g) por individuo, tasa de crecimiento específico (SGR), factor de conversión alimenticia (FCR) y el alimento consumido (g/biomasa).

A continuación, se presentan los resultados de los análisis proximales del músculo de la tilapia (Tabla 4). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los parámetros evaluados. Sin embargo, la variación en el contenido de lípidos podría atribuirse a un posible error metodológico, ya que no se utilizó consistentemente la misma zona del filete para el análisis. Es importante considerar que diferentes regiones del músculo presentan variaciones en la cantidad de grasa, lo que puede influir en los resultados. Este aspecto deberá ser tomado en cuenta en futuros estudios para garantizar una mayor precisión y consistencia en las mediciones.

Tabla 4. Análisis proximal de músculo de Tilapia roja.

	R1	R2	R3	DC
Proteína (%)	13.00 ± 1.30	12.83 ± 0.30	12.88 ± 0.25	13.34 ± 0.59
Lípidos (%)	6.82 ± 1.81	8.57 ± 0.69	6.72 ± 1.49	8.59 ± 1.08
Extracto libre de nitrógeno (%)	3.34 ± 3.03	2.59 ± 1.72	4.50 ± 1.50	1.15 ± 1.35
Humedad (%)	70.69 ± 2.85	70.43 ± 1.07	70.83 ± 1.05	71.75 ± 0.78
Cenizas (%)	6.15 ± 0.19	5.59 ± 0.85	5.07 ± 0.37	5.17 ± 0.17

Los valores representan el porcentaje promedio de 3 individuos ± desviación estándar. Los superíndices con letras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada fila.

3.3 Enfrentamiento a *Aeromonas hydrophila* CAIM675

La gráfica de mortalidad acumulada (Figura 2) muestra los resultados del desafío de Tilapia roja frente a la cepa de *Aeromonas hydrophila* CAIM675. El experimento tuvo una duración de 8 días, aunque las mortalidades cesaron para todos los grupos a partir del día 5.

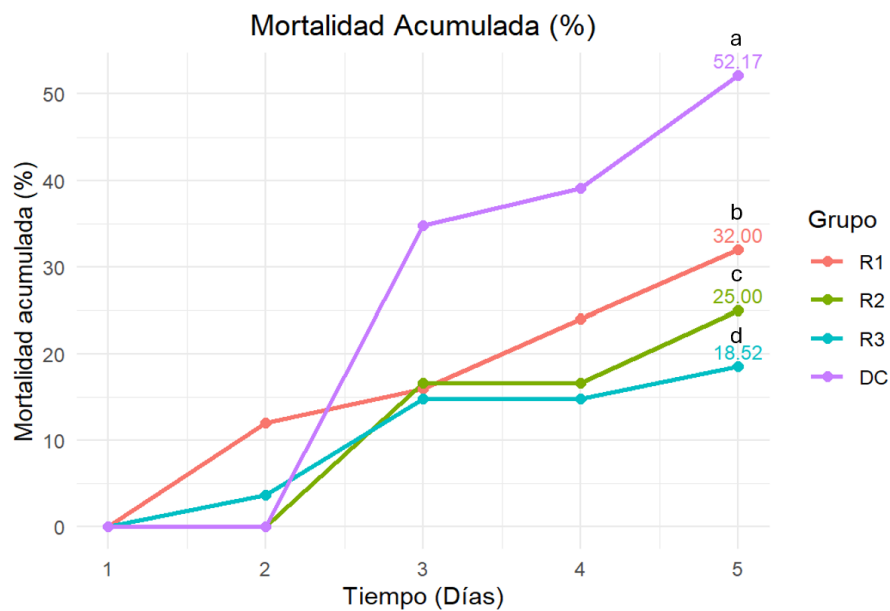


Figura 2. Mortalidad acumulada (%) por tratamiento. R1 32%, R2 25%, R3 18.52% y DC 52.17%.

El tratamiento control (DC) alcanzó el 50% de mortalidad en el día 5. La supervivencia final de los grupos fue la siguiente: R3 (81%), R2 (75%), R1 (68%) y DC (48%). Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, destacando el grupo R3 como el de mayor supervivencia, seguido de R2 y R1, mientras que el control presentó la menor supervivencia (48%). El nivel de protección relativa (NPR) fue mayor para R3 con 63%, seguido del R2 con 52%, el R1 con 38% y finalmente el control con 0%. Los peces no mostraron signos físicos de afecciones como úlceras o septicemia hemorrágica.

3.4 Costo-Eficiencia de los Tratamientos

En la Tabla 5 se muestra el Costo Total del Alimento (CTA) en pesos mexicanos (MXN) para todo el experimento y el Costo por Unidad de Biomasa (CUB) (MXN/Tonelada) para cada tratamiento. También se muestra la predicción de las posibles pérdidas económicas causadas por el patógeno *A. hydrophila* como resultado del enfrentamiento.

Tabla 5. Costo-Eficiencia de los Tratamientos.

Tratamiento	CTA (MXN/Ton)	Costo del alimento (MXN) usado en el experimento	CUB (MXN/Ton)	Pérdida de CUB (MXN/Ton) por el patógeno
R1	27880	36.89 ^a	53326	4984.02 ^a
R2	27880	42.47 ^{bc}	49324	4352.30 ^b
R3	27880	46.57 ^b	38398	3433.69 ^c
DC	26380	40.96 ^{ac}	37567	8320.43 ^d

Es importante destacar que el CTA no incluye otros factores relevantes, como costos operativos y de manejo sanitario, los cuales deben considerarse en un análisis económico más completo.

La dieta R1 tuvo el menor costo de alimento utilizado durante el experimento (36.89 MXN), resultado de un menor consumo debido al comportamiento alimenticio particular de los peces bajo este tratamiento. Sin embargo, esto se reflejó en un menor crecimiento, lo que aumentó el costo por unidad de biomasa (CUB), reduciendo su rentabilidad. En contraste, la dieta R3 destaca como la opción más eficiente, con el menor CUB (38.40 MXN/kg), demostrando que un mayor consumo de alimento, cuando es bien asimilado, resulta en beneficios económicos netos.

La proyección de pérdidas económicas ocasionadas por el patógeno *A. hydrophila* resalta la superioridad del tratamiento R3 en términos de resiliencia económica, con pérdidas estimadas de 3433.69 MXN/Ton, las más bajas entre los tratamientos. Esto puede atribuirse a la mayor supervivencia observada (81%), lo que refuerza el papel de los probióticos como agentes protectores frente a patógenos. En contraste, la dieta control (DC) mostró la mayor pérdida económica (8320.43 MXN/Ton), que se correlaciona con la baja supervivencia (48%).

Capítulo 4. Discusión

Los probióticos se han estudiado por más de 100 años (Vilà et al., 2010), aunque el primer experimento en animales acuáticos fue realizado por Kozasa en 1986, citado por Vilà y colaboradores (2010), quien usó *Bacillus toyoi* en dietas de jurel (*Seriola quinqueradiata*) para mejorar la tasa de crecimiento (Martínez-Cruz et al., 2012). Desde entonces, el género *Bacillus* se ha utilizado en diversas aplicaciones: como promotor de crecimiento, inhibidor de patógenos, mejorador de la digestibilidad de nutrientes y de calidad del agua, promotor de tolerancia al estrés y facilitador del desempeño reproductivo (Martínez-Cruz et al., 2012). Estos efectos se atribuyen principalmente a su capacidad de exclusión competitiva, mediante la cual las bacterias benéficas colonizan el intestino y limitan el establecimiento de patógenos (Vilà et al., 2010).

No obstante, como señala Vilà et al. (2010), la exclusión competitiva no siempre mejora el crecimiento de los organismos. En este experimento, las tilapias Pargo-UNAM en estado juvenil y cultivadas en agua de mar fueron alimentadas durante dos meses con dietas suplementadas con *Bacillus*. Los resultados mostraron que ninguna dieta probiótica produjo diferencias significativas ($p < 0.05$) en la ganancia de peso, tasa de crecimiento específico (SGR) o índice de conversión alimenticia (FCR) respecto al control. La dieta R3 mostró un crecimiento similar al control, mientras que las dietas R1 y R2 fueron menos efectivas, sugiriendo que el control y la dieta R3 fueron las más adecuadas para el crecimiento.

Sookchaiyaporn et al. (2020) y Moroni et al. (2021) también reportaron un rendimiento biológico similar entre tratamientos con el uso de probióticos en tilapia y dorada, respectivamente. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado mejoras en el crecimiento de tilapia con probióticos (Cavalcante et al., 2020; Tachibana et al., 2020; Olmos et al., 2022; Macías et al., 2024). Macías et al. (2024) obtuvieron una SGR de 0.899 en tilapia del Nilo cultivada en agua dulce, utilizando *Bacillus velezensis* B2, el mismo probiótico empleado en la dieta R2 de este estudio, que alcanzó un SGR de 0.52. En comparación, en este trabajo se obtuvieron buenos resultados con las dietas control y R3, con una SGR de 0.81 y 0.72, respectivamente, aunque ligeramente inferiores a los obtenidos con la tilapia del Nilo.

El análisis proximal del filete de tilapia fue similar al reportado por Ogunji et al. (2008), quienes utilizaron dietas formuladas con la inclusión de harina de gusano. Sin embargo, los valores de lípidos obtenidos en este estudio difieren significativamente de los reportados por Garduño-Lugo et al. (2003 y 2007), quienes trabajaron con tilapias de origen silvestre. Además, el porcentaje de proteína en los filetes analizados en

este estudio es ligeramente mayor, lo que podría atribuirse a las diferencias en la composición corporal entre las tilapias silvestres y las cultivadas analizadas en esta investigación. Estos resultados destacan que una nutrición adecuada puede influir positivamente en la calidad del filete deseado.

Por otro lado, la digestibilidad aparente no mostró diferencias significativas entre el grupo control y las dietas suplementadas con probióticos. Estos hallazgos coinciden con los resultados de Tachibana et al. (2020), quienes al utilizar *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* tampoco observaron mejoras en la digestibilidad.

En el estudio de Olmos et al. (2022) en el cual probaron el probiótico *Bacillus subtilis* 9b (R1 de este experimento) en Totoaba, se observó un patrón similar: no hubo diferencias significativas entre las dietas con probióticos y sin ellos cuando se sustituyó un 30% de la harina de pescado por concentrado de harina de soya. Sin embargo, al incrementar la sustitución al 60%, el uso del probiótico tuvo un efecto positivo más marcado, aunque los resultados no fueron tan buenos como en las dietas con un 30% de sustitución. Según los autores, la cantidad de nitrógeno libre proveniente de la harina de pescado podría estar afectando la actividad enzimática del *Bacillus*. Comparando esto con nuestros resultados, es posible que la ausencia de diferencias entre el grupo control y las dietas con probióticos en nuestro estudio también se deba a la calidad intrínseca de la dieta base y al bajo impacto del probiótico en un entorno con buenas condiciones digestivas iniciales.

Por su parte, el estudio de Mercado et al. (2025) evaluó diversos probióticos en totoaba, identificando que la cepa utilizada en el tratamiento R3 de este experimento (*Bacillus valezensis* V3) generó los mejores resultados. En su investigación, los peces alimentados con la dieta suplementada con *B. valezensis* V3 presentaron una ganancia de peso un 25% superior en comparación con la dieta control y un 80% mayor respecto a la dieta comercial. Esto sugiere que este probiótico fue capaz de eliminar factores antinutricionales del concentrado harina de soya y promover mejoras significativas tanto en el rendimiento del crecimiento como en la velocidad de este. Estos resultados subrayan la importancia de seleccionar una cepa probiótica adecuada al hospedador y al entorno para maximizar su efectividad y beneficios.

En nuestro experimento se empleó un alto porcentaje de harina de soya (46%), a diferencia del estudio de Mercado et al. (2025), donde utilizaron concentrado de harina de soya. Considerando que el concentrado de harina de soya contiene menos factores antinutricionales, sería conveniente incorporar este

ingrediente en futuras formulaciones para evaluar si mejora la actividad del probiótico y optimiza los resultados obtenidos

En la evaluación de la resistencia a patógenos, las tilapias fueron expuestas a *Aeromonas hydrophila* (4×10^6 UFC/mL). La dieta R3 con *Bacillus velezensis* V3 mostró la mayor supervivencia (81%), seguida de R2 con *B. velezensis* B2 (75%), R1 con *B. subtilis* 9b (68%) y el control (48%). La Tabla 6 resume los resultados de varios estudios que evaluaron la efectividad de ingredientes funcionales como agentes protectores contra patógenos en cultivos de tilapia. El probiótico *B. velezensis* B2 produjo los mejores resultados en el cultivo de tilapia del Nilo en agua dulce (Macías et al., 2024), con una mortalidad del 5%, aunque con lesiones ulcerativas, lo cual podría atribuirse a la menor carga bacteriana utilizada en dicho estudio, lo que permitió que el patógeno desarrollara síntomas de manera más gradual. En contraste, en el presente experimento, se duplicó la carga del patógeno, lo que resultó en una mortalidad rápida sin la aparición de síntomas externos.

Tabla 6. Comparación entre enfrentamientos a patógenos típicos de cultivo de tilapia. Orden descendente de supervivencia.

Autores	Especie	Ingrediente Funcional	Patógeno (CFU/mL)	Supervivencia	Días hasta 50% de mortalidad del control
Macias et al. (2024)	Tilapia del Nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	Probiótico: <i>Bacillus velezensis</i> B2	<i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675 (2×10^6 CFU/mL)	94%	15
Proyecto actual (2024)	Tilapia roja, Pargo-UNAM <i>Oreochromis</i> sp.	Probiótico: <i>Bacillus velezensis</i> V3	<i>Aeromonas hydrophila</i> CAIM675 (4×10^6 CFU/mL)	91%	5
Pachanawan et al. (2008)	Tilapia del Nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Psidium guajava</i> (dos formatos) y oxitetraciclina	<i>A. hydrophila</i> (3.44×10^6 CFU/mL)	≈90%	4
Cavalcante et al. (2020)	Tilapia del Nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	Probiótico (DBA®) + prebiótico (Mannan oligosaccharides)	<i>A. hydrophila</i> (1.26×10^8 CFU/mL)	70%	15
Mohammadi et al. (2020)	Tilapia del Nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	Extractos etanólicos de <i>Origanum vulgare</i> y <i>Melissa officinalis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> RTCC 1032 (1×10^8 Celulas/mL)	≈70%	7
Sookchaiyaporn et al. (2020)	Tilapia del Nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	Probiótico: <i>Bacillus</i> sp.	<i>Streptococcus agalactiae</i> (1×10^8 CFU/mL)	<50%	12

Cabe destacar que, a diferencia de los estudios previos, este estudio es el único que ha evaluado los probióticos en el híbrido pargo-UNAM cultivado en un ambiente de agua marina. Los resultados obtenidos con el probiótico (*B. velezensis* B2) incluido en la dieta R2 fueron buenos, aunque comparándolo con los resultados de Macías y colaboradores (2024) ellos obtuvieron una supervivencia 20% mayor que en nuestro caso, lo que sugiere que el desempeño del probiótico varía según el entorno y las interacciones específicas entre probiótico y hospedador (Segers & Lebeer, 2014). Pachanawan et al. (2008) obtuvieron muy buenos resultados, con un 90% de supervivencia en tilapia del Nilo utilizando tres ingredientes funcionales en distintos tratamientos, *Psidium guajava* en hoja en polvo y su extracto en etanol y oxitetraciclina.

Múltiples estudios han demostrado que los probióticos multicepa suelen ser más efectivos que los de cepa única; sin embargo, su eficacia depende en gran medida del objetivo específico y de la especie en cuestión. Van Doan et al. (2018) reportaron que la administración dietética de *Lactobacillus plantarum* N11 y *Bacillus velezensis* H3.1 mejoró significativamente el crecimiento de la tilapia del Nilo en sistemas de biofloc, al incrementar la tasa de crecimiento específico, la ganancia de peso, el peso final y la eficiencia de conversión alimenticia. De manera similar, Mohammadi et al. (2021) señalaron que los efectos de los probióticos pueden variar significativamente según las condiciones de cultivo. En su estudio, los probióticos multicepa demostraron ser más efectivos en sistemas de biofloc que en sistemas de renovación estancada, mejorando la respuesta inmune en comparación con los probióticos de cepa única. Estos hallazgos resaltan la importancia de optimizar la combinación de probióticos de acuerdo con las necesidades específicas del hospedador y las condiciones de cultivo, con el objetivo de maximizar los beneficios sinérgicos de cada cepa.

El análisis de costo-eficiencia de los tratamientos proporcionó información valiosa para evaluar la viabilidad económica de las dietas experimentales en comparación con un alimento comercial comúnmente utilizado en cultivos de tilapia roja. El alimento experimental utilizado en este estudio tiene un costo de 27,880 MXN/ton, sin incluir los costos asociados al proceso de producción. Por otro lado, el alimento comercial Nogafish Iniciador (3.5 mm), empleado durante la fase de aclimatación, tiene un costo de 28,600 MXN/ton. Cabe destacar que en este estudio no se incluyó un tratamiento con la dieta comercial, por lo que no fue posible realizar una comparación directa. Sin embargo, sería una excelente oportunidad realizar este análisis en futuras investigaciones, ya que permitiría evaluar la competitividad económica de las formulaciones probióticas, particularmente de la dieta R3.

Aunque la diferencia de costos entre las dietas experimentales y el alimento comercial es relativamente pequeña y teniendo en cuenta que no se incluyó una comparación experimental con la dieta comercial, los resultados del presente estudio sugieren que la dieta R3, al incorporar probióticos, ofrece un potencial significativo no solo en términos de competitividad económica, sino también en parámetros biológicos clave, como el crecimiento, la conversión alimenticia (FCR) y la supervivencia. Estos factores son determinantes para la rentabilidad de los cultivos, ya que un mejor desempeño biológico puede reducir el tiempo de cultivo, optimizar el uso del alimento y disminuir las pérdidas económicas en situaciones de desafíos sanitarios.

Desde una perspectiva práctica, las dietas enriquecidas con probióticos, como *Bacillus velezensis* V3 en R3, representan una herramienta valiosa para mejorar tanto la sostenibilidad económica como la resiliencia de los cultivos. En condiciones normales, la dieta R3 optimiza la relación costo-beneficio; bajo condiciones de estrés sanitario, como un brote de *A. hydrophila*, minimiza pérdidas económicas al mejorar la supervivencia de los peces.

Estos resultados subrayan el potencial de las dietas probióticas como estrategias innovadoras para la acuicultura sostenible. La combinación de costos accesibles, un alto rendimiento biológico y una mayor resistencia frente a patógenos resalta su aplicabilidad en cultivos comerciales de tilapia roja y otras especies acuícolas.

Capítulo 5. Conclusión

La dieta R3, enriquecida con *Bacillus velezensis* V3, demostró los mejores resultados en el desempeño biológico y resistencia al patógeno *Aeromonas hydrophila*, logrando la mayor supervivencia. Esto la posiciona como una opción adecuada para maximizar la producción de biomasa de manera eficiente y competitiva, al tiempo que reduce significativamente la mortalidad y las pérdidas económicas en caso de infecciones.

Capítulo 6. Líneas futuras de investigación y recomendaciones

- Hacer análisis enzimáticos con muestras de los intestinos para ver como interactúa el nuevo microbioma inducido por el probiótico y como se modula la actividad enzimática.
- Utilizar las mismas dietas en un sistema de biofloc, para observar la evolución del cultivo y ver si aporta beneficios tanto al desempeño biológico, como a la reducción del uso del agua
- Hacer más estudios con probióticos multicepa que combinen cepas previamente comprobadas como beneficiosas para el hospedador, como en el caso de la cepa utilizada en el tratamiento R3, explorando su efecto en sinergia con otras cepas.
- Añadir un tratamiento con una dieta comercial para poder realizar una comparación.
- Realizar secuenciación masiva de muestras de los intestinos para conocer los cambios en el microbioma de los organismos con los distintos probióticos

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>
- Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G., & Mohamed, M. F. (2008). Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, 277(1-2), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.021>
- Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR). (2022). *La acuicultura en España: Informe técnico*. Asociación Empresarial de Acuicultura de España. https://apromar.es/wp-content/uploads/2022/10/La_acuicultura_Espana_2022_v3_APROMAR.pdf
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). *Official methods of analysis*. Archivo PDF.
- Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2004). Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research*, 35(5), 436-446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01033.x>
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 173-186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Basri, L., Nor, R., Salleh, A., Yasin, I., Saad, M., Rahaman, N., Barkham, T., & Amal, M. (2020). Co-infections of tilapia lake virus, *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* in farmed red hybrid tilapia. *Animals*, 10(11), 2141. <https://doi.org/10.3390/ani10112141>
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44, 26-46. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2296-0>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Callihan, J. L., Harris, J. E., & Hightower, J. E. (2015). Coastal migration and homing of Roanoke River striped bass. *Marine and Coastal Fisheries*, 7(1), 301-315. <https://doi.org/10.1080/19425120.2015.1057309>
- Cavalcante, R. B., Telli, G. S., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Oshiro, E., Natori, M. M., Ferreira da Silva, W., & Ranzani-Paiva, M. J. (2020). Probiotics, prebiotics, and synbiotics for Nile tilapia: Growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture Reports*, 17, 100-343. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100343>
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: Luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, 25(10), 472-479. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.08.001>

- de Guia, A., Uy-de Guia, M. R., Monsarate, J., Salazar, J., Velasco, R., & Quiazon, K. M. (2024). Rapid detection of *Aeromonas hydrophila* in tilapia samples using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting the aerolysin gene. *CLSU International Journal of Science & Technology*, 8(1), 18-25. <https://doi.org/10.22137/ijst.2023.v8n1.02>
- Derome, N., Gauthier, J., Boutin, S., & Llewellyn, M. (2016). Bacterial opportunistic pathogens of fish. En C. J. Hurst (Ed.), *The Rasputin effect: When commensals and symbionts become parasitic* (pp. 81-108). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4_4
- 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>
- Fitzsimmons, K. (2000). Future trends of tilapia aquaculture in the Americas. En B. A. Costa-Pierce & J. E. Rakocy (Eds.), *Tilapia aquaculture in the Americas* (Vol. 2, pp. 252–264). World Aquaculture Society. <https://cales.arizona.edu/azaqua/ista/reports/FitzsimAmericas.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2009). *Oreochromis niloticus*. En *Cultured aquatic species fact sheets* (Texto de J. E. Rakocy; Editado y compilado por V. Crespi & M. New). FAO. https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/aquaculture/l1129m/file/es/es_niletilapia.htm
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2016). *Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation* (Y. S. Bajagai, A. V. Klieve, P. J. Dart & W. L. Bryden; Ed. H. P. S. Makkar). *FAO Animal Production and Health Paper No. 179*. FAO. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/2fda2226-b000-4cee-8186-8cacab86316b/content>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2022). *The state of world fisheries and aquaculture 2022: Towards blue transformation*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2024). *The state of world fisheries and aquaculture 2024 – Blue transformation in action*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) & World Health Organization (WHO). (2006). *Probiotics in foods: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. FAO Food and Nutrition. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/382476b3-4d54-4175-803f-2f26f3526256/content>
- Food and Drug Administration (FDA). (2020). *Notice to US Food and Drug Administration of the conclusion that the intended use of Bss-19 is generally recognized as safe*. GRAS Notice (GRN) N° 969. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/media/150352/download>
- Fuentes-Quesada, J. P., Viana, M. T., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Nomura-Solís, M., Gomez-Calle, V., Lazo, J. P., & Mata-Sotres, J. A. (2018). Enteritis induction by soybean meal in *Totoaba macdonaldi* diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture*, 495, 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.025>
- Furuya, W. M., Cruz, T. P. D., & Gatlin III, D. M. (2023). Amino acid requirements for Nile tilapia: An update. *Animals*, 13(5), 900. <https://doi.org/10.3390/ani13050900>

- Gardunño-Lugo, M., Granados-Álvarez, I., Olvera-Novoa, M., & Muñoz-Córdova, G. (2003). Comparison of growth, fillet yield and proximate composition between Stirling Nile tilapia (wild type) (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) and red hybrid tilapia (*Florida red tilapia* × *Stirling red O. niloticus*) males. *Aquaculture Research*, 34, 1023-1028. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00904.x>
- Gardunño-Lugo, M., Herrera-Solís, J. R., Angulo-Guerrero, J. O., Muñoz-Córdova, G., & De la Cruz-Medina, J. (2007). Nutrient composition and sensory evaluation of fillets from wild-type Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) and a red hybrid (*Florida red tilapia* × *red O. niloticus*). *Aquaculture Research*, 38(10), 1074-1081. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01773.x>
- Glencross, B. D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2), 71-124. <https://doi.org/10.1111/J.1753-5131.2009.01006.X>
- 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>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 35-73. <https://doi.org/10.1128/cmr.00039-09c>
- Janštová, B., & Lukášová, J. (2001). Heat resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Veterinaria Brno*, 70(2), 179-184. https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb_2001070020179.pdf
- Klinger, D., & Naylor, R. (2012). Searching for solutions in aquaculture: Charting a sustainable course. *Annual Review of Environment and Resources*, 37, 247-276. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-021111-161531>
- Knights, B. (1985). Energetics and fish farming. En P. Tytler & P. Calow (Eds.), *Fish energetics* (pp. 309-304). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-011-7918-8_12
- Kozasa, M. (1986). Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 4, 121-135. Archivo PDF.
- Kuebutornye, F., Wang, Z., Lu, Y., Abarike, E., Sakyi, M. E., Li, Y., Xie, C. X., & Hlordzi, V. (2020). 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>
- Lingyuan, S., Yan, Z., Yindu, S., Liangliang, Z., Chenxi, M., & Jinliang, Z. (2021). Effects of saline-alkaline water on growth performance, nutritional processing, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 544, 737036. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737036>
- Li, X., Zheng, S., & Wu, G. (2021). Nutrition and functions of amino acids in fish. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1285, 133-168. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54462-1_8
- López, L. M., Olmos-Soto, J., Trejo-Escamilla, I., Flores-Ibarra, M., Ochoa, L., Drawbridge, M., & Peres, H. (2016). Evaluation of carbohydrate-to-lipid ratio in diets supplemented with *Bacillus subtilis*

- probiotic strain on growth performance, body composition and digestibility in juvenile white seabass (*Atractoscion nobilis*, Ayres 1860). *Aquaculture Research*, 47(6), 1864-1873. <https://doi.org/10.1111/are.12644>
- Mansour, A., Mahfouz, N. B., Husien, M. M., Omer, A. A., & Moustafa, E. M. (2019). Molecular characterisation and pathogenicity evaluation of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from cultured tilapia *Oreochromis niloticus* in Egypt. *Indian Journal of Fisheries*, 66(2), 93-100. <https://doi.org/10.21077/ijf.2019.66.2.84524-13>
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Herмосillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Mercado, V., Olmos, J., López, L. M., & Galaviz, M. A. (2025). First report of significant growth improvement of *Totoaba macdonaldi* using *Bacillus* and soy. *Aquaculture International*, 33(1), 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01753-4>
- Miao, W., & Wang, W. (2020). Trends of aquaculture production and trade: Carp, tilapia, and shrimp. *Asian Fisheries Science*, 33(S1), 1-10. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2020.33.S1.001>
- Mohammadi, G., Rafiee, G., El Basuini, M. F., Van Doan, H., Ahmed, H. A., Dawood, M. A., & Abdel-Latif, H. M. (2020). *Origanum vulgare*, *Hypericum perforatum*, and *Melissa officinalis* extracts improved the growth rate, antioxidative, and immunological responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports*, 18, 100445. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100445>
- Mohammadi, G., Rafiee, G., Tavabe, K. R., Abdel-Latif, H. M. R., & Dawood, M. A. O. (2021). The enrichment of diet with beneficial bacteria (single- or multi-strain) in biofloc system enhanced the water quality, growth performance, immune responses, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 539, 736640. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736640>
- Moroni, F., Naya-Català, F., Piazzon, M. C., Rimoldi, S., Calduch-Giner, J., Giardini, A., Martínez, I., Brambilla, F., Pérez-Sánchez, J., & Terova, G. (2021). The effects of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain used as probiotic on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, gut microbiota, and transcriptional response. *Frontiers in Marine Science*, 8, 659519. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.659519>
- Muñoz-Córdova, G. (2020). *Pargo-UNAM. Orígenes, productividad y manejo*. Universidad Nacional Autónoma de México. https://www.fmz.unam.mx/fmvz/centros/ceiegt/archivos/Manual_Pargo_UNAM.pdf
- Nayak, S. K. (2021). Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 862-906. <https://doi.org/10.1111/raq.12503>
- Newman, S. G., & Majnarich, J. J. (1982). Direct immersion vaccination of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), and juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), with a *Yersinia ruckeri* bacterin. *Journal of Fish Diseases*, 5(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1982.tb00489.x>

- Nhinh, D., Giang, N., Van, K., Dang, L., Dong, H. & Hoai, T. (2022). Widespread presence of a highly virulent *Edwardsiella ictaluri* strain in farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), 2276-2290. <https://doi.org/10.1111/tbed.14568>
- Nhinh, D., Hoa, D., Giang, N., Van, K., Dang, L., Crumlish, M., Dong, H., & Hoai, T. (2023). Synergistic infection of *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium oreochromis* in cage cultured tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal of Fish Diseases*. <https://doi.org/10.1111/jfd.13832>
- Nicholson, P., Mon-On, N., Jaemwimol, P., Tattiyapong, P., & Surachetpong, W. (2020). Coinfection of tilapia lake virus and *Aeromonas hydrophila* synergistically increased mortality and worsened the disease severity in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture*, 520, 734-746. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734746>
- North America Technical Committee on Food Components for Health Promotion (ILSI). (1999). Safety assessment and potential health benefits of food components based on selected scientific criteria. *ILSI North America Technical Committee on Food Components for Health Promotion. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 203-216. Archivo PDF.
- 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., & 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. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000169>
- Olmos-Soto, J., & Contreras-Flores, R. (2003). Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 369-373. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1289-4>
- Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J. D. J., López, L., & Ochoa, L. (2015). Functional feeds in aquaculture. In S.-K. Kim (Ed.), *Springer Handbook of Marine Biotechnology* (pp. 1303-1319). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8_59
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2021). *Fisheries and Aquaculture in Mexico*. OECD Review of Fisheries Country Notes January 2021. [https://one.oecd.org/document/TAD/FI\(2022\)6/FINAL/en/pdf](https://one.oecd.org/document/TAD/FI(2022)6/FINAL/en/pdf)
- Pachanawan, A., Phumkhachorn, P., & Rattanachakunsoon, P. (2008). Potential of *Psidium guajava*-supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(5), 419-424. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.419>
- Peggs, D. L. (2015). *Effects of dietary ingredients and feed additives on the health and production of European sea bass (Dicentrarchus labrax) for applications in aquaculture* [Doctoral thesis, Plymouth University, UK]. <https://pearl.plymouth.ac.uk/bms-theses/333>
- Pérez-Chabela, M., Yenizey, M., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura: una revisión. *Hidrobiológica*, 30(1), 93-105. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/Perez>

- Peso-Echarri, P., Frontela-Saseta, C., González-Bermúdez, C. A., Ros-Berrueto, G. F., & Martínez-Graciá, C. (2012). Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenano y ulvano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(3), 373-381. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000300001>
- Prabu, E., Rajagopalsamy, C. B. T., Ahilan, B., Jeevagan, I. J. M. A., & Renuhadevi, M. J. A. R. (2019). Tilapia: An excellent candidate species for world aquaculture: A review. *Annual Research & Review in Biology*, 31(3), 1-14. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v31i330052>
- Rajme-Manzur, D., Hernández-López, J., Martínez-Porchas, M., Vargas-Albores, F., Garibay-Valdez, E., Coronado-Molina, D., Hernandez-Oñate, M., Vázquez-Ramírez, F., Velázquez-Valencia, L., & Santacruz, A. (2023). *Staphylococcus haemolyticus* and *Providencia vermicola* infections occurring in farmed tilapia: Two potentially emerging pathogens. *Animals*, 13. <https://doi.org/10.3390/ani13233715>
- Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringo, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*, 18, 465-492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>
- Robaina, L. (1998). *Utilización nutritiva de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde para dorada (Sparus aurata)* (Technical report). Instituto Canario de Ciencias Marinas, Gran Canaria. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>
- Rodrigues, M. V., Dias, M. F. F., Francisco, C. J., David, G. S., da Silva, R. J., & Junior, J. P. A. (2019). *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Brazilian aquaculture: A public health problem. *Emergent Life Sciences Research*, 5, 48-55. <https://doi.org/10.31783/elsr.2019.514855>
- Rodríguez, M., Botero, E., Iregui, C. A., & Figueroa, J. (2005). *Aeromonas hydrophila* extracellular products extraction and its effects on tilapia roja (*Oreochromis spp.*) and cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Acta Biológica Colombiana*, 10(2), 75-94. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2005000200006&lng=en&tlng=
- Ruelas, L., López, G. E., & Canela, M. V. (2020). Uso y disposición del agua en la acuicultura: ¿Falta o exceso de regulación? *Teoría y Praxis*, (29), 26-46. <https://doi.org/10.22403/typ.v1i29.8>
- Secor, D. H., Gunderson, T. E., & Karlsson, K. (2000). Effect of temperature and salinity on growth performance in anadromous (Chesapeake Bay) and nonanadromous (Santee-Cooper) strains of striped bass *Morone saxatilis*. *Copeia*, 2000(1), 291-296. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2000\)2000\[0291:EOTASO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2000)2000[0291:EOTASO]2.0.CO;2)
- Secor, D. H., & Houde, E. D. (1995). Temperature effects on the timing of striped bass egg production, larval viability, and recruitment potential in the Patuxent River (Chesapeake Bay). *Estuaries*, 18, 527-544. <https://doi.org/10.2307/1352370>
- Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
- Shen, W. Y., Fu, L. L., Li, W. F., & Zhu, Y. R. (2010). Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth performance, immune response, and antioxidant activities of the shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research*, 41(11), 1691-1698. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02554.x>
- Sonnenschein, A. L., Losick, R., & Hoch, J. A. (1993). *Bacillus subtilis and others Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics*. American Society for Microbiology.
- Sookchaiyaporn, N., Srisapoome, P., Unajak, S., & Areechon, N. (2020). Efficacy of *Bacillus* spp. isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linn. on its growth and immunity, and control of pathogenic bacteria. *Fisheries Science*, 86, 353-365. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01394-0>
- Sumithra, T., Reshma, K., Anusree, V., Sayooj, P., Sharma, S., Suja, G., Amala, P., Joseph, S., & Sanil, N. (2019). Pathological investigations of *Vibrio vulnificus* infection in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) cultured at a floating cage farm of India. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734217>
- Thune, R. L., Stanley, L. A., & Cooper, R. K. (1993). Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 37-68. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)90028-A](https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90028-A)
- Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Khanongnuch, C., Kanpiengjai, A., Unban, K., Van Kim, V., & Srichaiyo, S. (2018). Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance, and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 491, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03>.
- Vázquez, A. P. (2016). *Bacillus* species are superior probiotic feed-additives for poultry. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 2(3), 23-25. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2016.02.00023>
- Vázquez-Vera, L., Carreño, P. C., Rafful, B. C., Lucero, I. L., Apolinar, V. Á., Vázquez-Arce, D., & Velasco, A. H. (2022). *Diagnóstico de la acuicultura en México*. Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza, A.C. https://www.researchgate.net/profile/Leonardo-Vazquez-Vera/publication/361250469_Diagnostico_de_la_acuicultura_en_Mexico/links/62a63e6f55273755ebe7acfd/Diagnostico-de-la-acuicultura-en-Mexico.pdf
- Vilà, B., Esteve-García, E., & Brufau, J. (2010). Probiotic micro-organisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action. *World's Poultry Science Journal*, 66(3), 369-380. <https://doi.org/10.1017/S0043933910000474>
- Wang, Y., & Xu, Z. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127(3-4), 283-292. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003>
- Watanabe, W., Losordo, T., Fitzsimmons, K., & Hanley, F. (2002). Tilapia production systems in the Americas: Technological advances, trends, and challenges. *Reviews in Fisheries Science*, 10, 465-498. <https://doi.org/10.1080/20026491051758>
- Watanabe, W. O., Olla, B. L., Wicklund, R. I., & Head, W. D. (1997). Saltwater culture of the Florida red tilapia and other saline-tolerant tilapias: A review. *Tilapia Aquaculture in the Americas*, 1, 54-141. <http://dx.doi.org/10.1080/20026491051758>