



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**

---



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y  
FORESTALES**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“MICROBIOTA INTESTINAL DE JUVENILES Y ADULTOS *Chirostoma estor*  
(Piscis: Atherinopsidae) EN AMBIENTE SILVESTRE Y EN CULTIVO”**

## **TESIS**

**PRESENTA:**

**M. en C. JESUS MATEO AMILLANO CISNEROS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ASESOR:**

**DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS**

**COASESORA:**

**DRA. LUCIANA RAGGI HOYOS**

Morelia, Michoacán, mayo de 2022



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**

---



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y  
FORESTALES**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“MICROBIOTA INTESTINAL DE JUVENILES Y ADULTOS *Chirostoma estor*  
(Piscis: Atherinopsidae) EN AMBIENTE SILVESTRE Y EN CULTIVO”**

## **TESIS**

***PRESENTA:***

**M. en C. JESUS MATEO AMILLANO CISNEROS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

***COMITÉ DE TUTORES:***

**DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS  
DRA. LUCIANA RAGGI HOYOS  
DR. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN  
DRA. PAMELA NAVARRETE RAMÍREZ  
DR. BRUNO GÓMEZ GIL RODRÍGUEZ SALA**

Morelia, Michoacán, mayo de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente a Dios, por haberme brindado ganas de estudiar, por protegerme de todos los peligros que hay en la vida, por darme las fuerzas para lograr esta meta, por haberme dado la oportunidad de disfrutar y compartir con mi familia, con mi hija Isabella, con mi esposa Anel y amigos de esta etapa de mi vida.

A San Judas Tadeo, por darme siempre la fuerzas para seguir con el trabajo a pesar de todos los distractores y por creer en mis capacidades, aunque muchas veces creí difícil lograr esta meta.

A mi esposa Anel Fuentes Valencia y a mi hija Isabella Amillano Fuentes por darme las fuerzas y el amor para ayudar a completar esta meta.

A mi mamá Anabella Cisneros Tirado, a mi papá Mateo Amillano Zatarain, a mis hermanos Lucía Concepción (Concha), María Candelaria, Martha Olivia, Moisés, David, Abraham, Ana Gabriela, Elsa Guadalupe y Brayan Antonio por su apoyo desde siempre, por sus enseñanzas y aprendizajes desde que me acuerdo y tengo uso de conciencia, mismos que me ayudaron a lograr esta meta.

A mi director de tesis al Dr. Carlos Antonio Marínez Palacios, porque desde el momento en que entré a su laboratorio me ha brindado su apoyo incondicional, por su gran y valiosa experiencia, y por su entera disposición.

A la Dra. Luciana Raggi Hoyos por su apoyo incondicional, por estar siempre a disposición de mis dudas, apoyarme profundamente en las ideas acerca de este trabajo, por trabajar conmigo a altas horas de muchas noches a pesar de que siempre está saturada de un sinfín de trabajos, por su amistad.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a todo el personal que labora en esta Universidad por facilitarme los medios y herramientas que necesitaba para alcanzar esta meta.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Pamela Navarrete Ramírez, el Dr. Juan José Valdéz Alarcón y el Dr. Bruno Gómez Gil, por su entera disposición y sus grandes consejos para la elaboración de este trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a todo el personal que labora en esta Universidad, por facilitarme los medios y herramientas que necesitaba para alcanzar esta meta.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría.

A mis amigos Guadalupe Pámanes Morales, Iván Martínez Martínez, Yulissa Vargas Huipio y Arturo Gómez por su amistad y por su invaluable ayuda durante el experimento de este proyecto.

A mi amigo Isaías Nefalí Hernández quien me apoyó en momentos difíciles cuando muchas veces estuve cansado y pensé que no iba a lograr esta meta. Gracias men.

Al Laboratorio Nacional de Nutrigenómica, Microbiómica y Digestiva Animal y al personal que labora en el mismo.

A los amigos que me quedan de la Universidad (José Andres Zamora el oso, Smath Adrián García el Coy, José Manuel Jaime el Harry y Marcelino Ruíz el cabeza de CPU), quienes a la distancia me han mostrado su apoyo.

A mis sobrinos Itzel, Roberto, Gibrand, Juanito, Carlitos, Hilda, Lucía, Mateo y Abrahamcito, quienes a pesar de la distancia física, siempre los llevo en el corazón.

A mis mascotas, en especial al negro, gabacho, panfilo, peluso y coyote, quienes ya no están en este mundo y quienes me hicieron más felices las diferentes etapas de mi vida. Mi coyote, te me fuiste cuando estaba realizando el experimento de este trabajo. Sufrí mucho cuando supe que te fuiste de este mundo y que no pude verte en tus últimos instantes de vida. Aprendí mucho de tí mi amigo. A dumbis la guerrera quien es una buena mascota quien ha aguantado los malos embates de la vida, y que a pesar de ello, es buena.

## CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN GENERAL.....	1
II. SUMMARY.....	3
III. ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	5
IV. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	6
V. HIPÓTESIS GENERAL.....	14
V.1 Hipótesis capítulo 1.....	14
V.2 Hipótesis capítulo 2.....	14
VI. OBJETIVO GENERAL.....	15
VII. ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	16
VII.1. Microbiota en ambientes de desarrollo del pez blanco.....	16
VII.1.1. Recolección de muestras.....	16
VII.1.2. Extracción de ADN y análisis bioinformático.....	17
VII.1.3. Análisis estadístico y predicción funcional por PICRUST2.....	17
VII.2. Experimento de adición de prebióticos y simbióticos.....	18
VII.2.1. Diseño experimental.....	18
VII.2.2. Preparación de las dietas.....	20
VII.2.3. Colecta de muestras y análisis.....	21
VII.2.4. Análisis de composición proximal.....	22
VII.2.5. Rendimiento de crecimiento y tasa de supervivencia.....	22
VII.2.6. Extracción de ADN y análisis bioinformático.....	23
VII.2.7. Análisis estadístico y predicción funcional por PICRUST2.....	23

## Capítulo 1.

Microbiota intestinal de <i>Chirostoma estor</i> adulto en ambiente silvestre (Lago de Pátzcuaro) y ambientes de cultivo intensivo y extensivo.....	24
Objetivos específicos capítulo 1.....	25

## Capítulo 2.

Efectos de prebióticos y simbióticos sobre el crecimiento y la microbiota intestinal de juveniles de <i>Chirostoma estor</i> en cautiverio.....	26
Objetivos específicos capítulo 2.....	27

VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....	28
------------------------------	----

IX. CONCLUSIONES.....	36
-----------------------	----

X. APÉNDICES.....	37
-------------------	----

A1. Análisis del perfil de ácidos grasos experimento prebióticos y simbióticos.....	37
---	----

A1.1. Resultados análisis perfil de ácidos grasos.....	37
--	----

A1.2. Discusión análisis perfil de ácidos grasos.....	38
---	----

A2. Análisis metabolómico.....	42
--------------------------------	----

A2.1. Extracción de muestras para el análisis de metabolitos.....	42
---	----

A2.2. Prueba para determinar metabolitos en intestino e hígado de pez blanco por Resonancia Magnética Nuclear.....	42
--	----

A2.3 Resultados preliminares de la prueba del análisis de espectros de metabolitos de intestinos e hígados de pez blanco.....	44
---	----

A2.4 Procesamiento de muestras.....	45
-------------------------------------	----

A2.5 Análisis del metaboloma por espectroscopia de RMN.....	47
---	----

A2.6 Análisis estadístico.....	48
--------------------------------	----

A2.7 Relación entre la microbiota y los metabolitos.....	48
A3. Procesamiento de muestras para histología.....	49
A4. Procesamiento de muestras de hígado derivadas del experimento.....	49
XI. REFERENCIAS.....	50
XI.1 Referencias Introducción general.....	50
XI.2 Referencias Estrategia metodológica.....	59
XI.3 Referencias Discusión general.....	59
XI.4 Referencias Apéndices.....	77
XII. Anexos.....	80

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Ciencias ómicas y su interacción	11
<b>Figura 2.</b> Componentes del intestino del pez blanco <i>Chirostoma estor</i> separados en digesta, intestino anterior e intestino posterior.	17
<b>Figura 3.</b> Esquema del diseño experimental y dosis de prebióticos y simbióticos aplicados a las dietas de los peces blancos <i>Chirostoma estor</i> .	19

### Capítulo 1

**Figure 1.** Gut microbiota diversity.

**Figure 2.** Beta diversity analysis.

**Figure 3.** Core microbiota amongst different environmental groups.

**Figure 4.** Genera prevalence deduced by LEfSe analysis.

**Figure 5.** Heatmap and dendrogram of KOs pathways in 9 different groups.

**Figure S1.** *Chirostoma estor* gut.

**Figure S2.** Microbiota genera core.

**Figure S3.** Heatmap of the 60 most abundant functional pathways inferred by PICRUSt2 in all 9 sample groupings.

**Figure S4.** Statistical differences between the 9 sample groups and their inferred PICRUSt2 KOs pathways.

### Capítulo 2

**Figure 1.** Relative abundance of gut microbiota of pike silverside feed with control, prebiotics (inulin, cell wall) and synbiotics (*Lactobacillus acidophilus* + inulin, *L. acidophilus* + cell wall) treatments in Phylum level (A) and in genus level (B).

**Figure 2.** Richness Chao1 and Shannon diversity Index (A) and Non-



metric Multidimensional Scaling (NMDS) plot (B) between treatments control, prebiotics and synbiotics, calculated with OTUs data.

**Figure 3.** RDA (A) and CCA (B) analysis relationship microbiota-growth fish.

**Figure 4.** Comparison of LDA effect size of the significantly differentiating microbial genus deduced using LEfSe analysis among all control, prebiotics and synbiotics treatments (C, Control; I, Inulin; W, Cell wall; L+I, *Lactobacillus acidophilus* + Inulin; L+W, *L. acidophilus* + Cell wall).

**Figure 5.** UpSet plot representing the presence of genus in control, prebiotics and synbiotics treatments. Control (C), Inulin (I), Cell wall (W), *Lactobacillus acidophilus* + Inulin (L+I), *L. acidophilus* + Cell wall (L+W).

**Supplementary Fig. 1.** Comparison of LDA effect size of the significantly differentiating microbial Phylum deduced using LEfSe analysis among all control, prebiotics and synbiotics treatments (C, Control; I, Inulin; W, Cell wall; L+I, *Lactobacillus acidophilus* + Inulin; L+W, *L. acidophilus* + Cell wall).

**Supplementary Fig. 2.** Heatmap of the 60 most abundant functional pathways inferred by PICRUSt2 in 5 all treatments of control, prebiotics and synbiotics.

**Supplementary Fig. 3.** Heatmap and dendrogram of the average KOs pathways in all 5 treatments of control, prebiotics and synbiotics.

**Supplementary Fig. 4.** Heatmap and dendrogram of the all samples KOs pathways in all 5 treatments of control, prebiotics and synbiotics.

**Supplementary Fig. 5.** Differences (STAMP analysis) between the 5 treatments and their inferred PICRUSt2 KOs pathways edited in MEGAN5.

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Ingredientes que componen la dieta basal de <i>Chirostoma estor</i> .	18
<b>Tabla 2.</b> Pruebas de viabilidad de <i>L. acidophilus</i> en los tratamientos simbióticos durante el experimento.	21
<b>Tabla A1.</b> Perfil de ácidos grasos de peces blancos <i>Chirostoma estor</i> eviscerados alimentados con prebióticos y simbióticos (Promedio $\pm$ Desviación estándar).	38

### Capítulo 1

**Table 1.** Total mean relative abundance (%) (first column)  $\pm$  SE, and mean relative abundance  $\pm$  SE of the 20 most prevalent genera found in guts from different environments.

**Table S1.** *Chirostoma estor* weight and length measurements.

**Table S2.** Total mean relative abundance (%) (first column)  $\pm$  SE, and mean relative abundance  $\pm$  SE of the 9 most prevalent Phyla and 2 Classes of Proteobacteria found in intestinal components (D, A, P) samples of *C. estor* of three environments (LP, C, E).

**Table S3.** Alpha diversity.

**Table S4.** Beta diversity per environment.

**Table S5.** Beta diversity per intestinal component.

**Table S6.** Core microbiota.

### Capítulo 2

**Table 1.** Ingredients used and proximate composition of control, prebiotics and synbiotics treatments.

**Table 2.** Proximate carcass composition of *C. estor* at different treatments (% on a wet matter basis  $\pm$  SD).

**Table 3.** Mean values and standard deviations for variables of zootechnical performance of pike silverside *C. estor*, fed with control (C), prebiotics (inulin, I; cell wall of *S. cerevisiae*, W) and synbiotics (*Lactobacillus acidophilus* + inulin, L+I; *L. acidophilus* + cell wall, L+W) diets for 12 weeks.

**Table 4.** Total mean (%) relative abundance (first column)  $\pm$  SE, and mean relative abundance  $\pm$  SE of the 30 genus prevalent found in gut samples of pike silverside seed with control, prebiotics and synbiotics.

**Supplementary Table 1.** Total mean (%) relative abundance (first column)  $\pm$  SE, and mean relative abundance  $\pm$  SE of the 9 most prevalent Phyla and 2 Class of Phylum Proteobacteria found in gut samples of pike silverside seed with prebiotics and synbiotics.

**Supplementary Table 2.** Mean  $\pm$  SD of alpha diversity (richness Chao1 and Shannon diversity) of data of gut microbiota between treatments (Control, C; Inulin, I; Cell wall, W; *Lactobacillus* + inulin, L+I; *Lactobacillus* + cell wall, L+W).

**Supplementary Table 3.** Analysis of similarity (ANOSIM) and Permutational multivariate analysis of variance (Adonis) of data of intestinal microbiota between control, prebiotics and synbiotics treatments.

## I. RESUMEN GENERAL

La microbiota “dominada por bacterias” cumple funciones importantes en peces como es la estimulación del sistema inmune y la síntesis de metabolitos relacionados con crecimiento. En general, la microbiota asociada a organismos es influenciada por factores cambiantes como son el hábitat y la etapa de desarrollo del hospedero, y en particular, la microbiota intestinal de peces en cultivo controlado puede ser alterada por la aplicación de suplementos prebióticos y probióticos a la dieta. Estos suplementos también intervienen en la mejora del crecimiento y supervivencia, gracias a que activan el sistema inmune. En este estudio se caracteriza por primera vez la microbiota intestinal del pez blanco *Chirostoma estor* en estado adulto proveniente de ambientes silvestre (Lago de Pátzcuaro) y ambiente controlado (cultivo), determinando así la línea base de la microbiota bacteriana, lo que posteriormente permite estudiar su dinámica en experimentos nutricionales o ambientales. También se presenta en este trabajo, un experimento nutricional llevado a cabo durante 12 semanas en donde se aplicaron prebióticos (inulina de *Agave tequilana*, pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*) y simbióticos (del inglés synbiotics, significando pre- y probióticos simultáneamente): *Lactobacillus acidophilus* + inulina y *L. acidophilus* + pared celular, a la dieta de juveniles de *C. estor* para determinar sus efectos en la microbiota intestinal y en el crecimiento. Estos estudios microbiómicos se realizaron por metagenómica de amplicones, extrayendo ADN de digesta e intestino anterior y posterior de peces adultos silvestres y cultivados (N=74), e intestino de peces juveniles alimentados con prebióticos y sinbióticos (N=42), para enseguida realizar secuenciación por Illumina Miniseq de la región V3 del gen ARNr 16S y realizar análisis bioinformático de los amplicones generados. De los peces experimentales se tomaron datos biométricos para determinar efectos en crecimiento. En los resultados de análisis de la microbiota intestinal entre ambientes, por medio de análisis de alfa diversidad y de abundancia diferencial por LEfSe, se observa que existe una reducción considerable de géneros bacterianos en el intestino de peces cultivados comparados con peces silvestres provenientes del Lago, sugiriendo una pérdida de la diversidad bacteriana cuando los peces se cambian de un hábitat dinámico, con alta variación de alimento silvestre a un ambiente controlado, donde el alimento es reducido a una dieta balanceada. En cuanto a la microbiota intestinal influenciada por prebióticos y probióticos, se observa un incremento significativo en la abundancia de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Weissella* cuando se agregan simbióticos y el prebiótico inulina al compararlos con el tratamiento control. A pesar de estos cambios, se mantiene una microbiota constante, a la que llamamos core o núcleo (calculada por la presencia de géneros bacterianos en al menos el 80% de las muestras analizadas para los análisis por separado de peces de

ambientes silvestre y controlado, y de peces alimentados por tratamientos prebióticos y simbióticos). En los peces analizados por ambiente la core microbiota está conformada por los géneros: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Weissella*. Por otro lado, la core microbiota encontrado en peces alimentados con prebióticos y simbióticos está compuesto por los géneros: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* y *Thermogemmatispora*. Aunado a este análisis de core microbiota, destaca que los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Spiroplasma* están presentes tanto en peces de ambientes como en los alimentados con prebióticos y simbióticos, bacterias que pueden tener una función relevante en el desarrollo de *C. estor*. El análisis del efecto sobre el crecimiento durante el experimento, muestra que los simbióticos mejoraron significativamente la longitud y el peso corporal final, la ganancia de peso, la tasa de ganancia de peso, la tasa de crecimiento específica y el factor de condición cuando se comparó con los tratamientos control y prebióticos. Además, el tratamiento con el prebiótico pared celular incrementó significativamente estos valores analizados respecto al control y al prebiótico inulina, aunque fue significativamente menor que los tratamientos simbióticos. El análisis de relación de bacterias encontradas con los valores calculados de crecimiento, indica que el género *Lactobacillus* está asociado a este mayor crecimiento. Los resultados de este trabajo demuestran que la microbiota puede variar por cambios de hábitat, siendo más diversa en el medio silvestre y reducida en cultivo, y por influencia de prebióticos y probióticos. Además, prevalecen géneros definidos como core microbiota a pesar de estos cambios. Estos géneros presentes tanto en peces del medio silvestre como en peces en cultivo, podría apuntalarse para estudios de aislamiento o enriquecimiento y aplicación de estos como probióticos en dietas para peces de cultivo, pudiendo tener un efecto positivo en el crecimiento de *C. estor* y peces similares. Aunado a esto, y basado en los resultados encontrados en cuanto a crecimiento, es posible realizar futuros experimentos en donde se adicione pared celular como prebiótico con distintas dosis y tiempos de aplicación, para determinar sus efectos sobre el crecimiento y modulación de la microbiota intestinal principalmente, como una alternativa de bajo costo para el manejo, aplicación y producción, en términos de elaboración de grandes cantidades de alimentos, a comparación de la suplementación con probióticos y simbiótico.

**Palabras clave:** Microbiota, hábitat, simbióticos, crecimiento, *C. estor*.

## II. SUMMARY

The microbiota “dominated by bacteria” performs important functions in fish such as the stimulation of the immune system and the synthesis of metabolites related to growth. In general, microbiota associated with organisms is influenced by changing factors such as habitat and host developmental stage, and in particular, the gut microbiota of fish in controlled culture conditions can be altered by the application of prebiotic and probiotic supplements to the diet. These supplements are also involved in improving growth and survival, because they activate the immune system. In this study the intestinal microbiota of the pike silverside fish *Chirostoma estor* is characterized for the first time in the adult fish from wild (Lake Pátzcuaro) and controlled culture environment, thus determining the baseline of the bacterial microbiota, which then allows us to study its dynamics in nutritional or environmental experiments. Also presented in this work, a nutritional experiment carried out during 12 weeks where prebiotics (inulin of *Agave tequilana*, cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*) and synbiotics were applied (synbiotics, meaning pre- and probiotics simultaneously): *Lactobacillus acidophilus* + inulin and *L. acidophilus* + cell wall, to the diet of juveniles of *C. estor* to determine its effects on the intestinal microbiota and growth. These microbial studies were performed by amplicon metagenomics, extracting DNA from digesta and anterior and posterior intestine from wild and cultured adult (N=74), and gut from juvenile fish fed prebiotics and synbiotics (N=42), to then perform Illumina Miniseq sequencing of the 16S rRNA gene V3 region and bioinformatic analysis of the amplicons generated. Biometric data were taken from the experimental fish to determine growth effects. In the results of analysis of the intestinal microbiota between environments, by means of analysis of alpha diversity and differential abundance by LEfSe, there is a significant reduction in bacterial genera in the fish gut from cultivated compared to gut wild fish from the lake. This suggests a loss of bacterial diversity when fish are switched from a dynamic habitat with high variation of wild food to a controlled environment where food is reduced to a balanced diet. As for the intestinal microbiota influenced by prebiotics and probiotics, a significant increase in the abundance of lactic acid bacteria *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* and *Weissella* is observed, when synbiotics and prebiotic inulin are added and compared with control treatment. Despite these changes, a constant microbiota is maintained, which we call core or nucleus (calculated by the presence of bacterial genera in at least 80% of the samples analysed for separate analyses of wild and controlled fish and fish fed by prebiotic and synbiotic treatments). In the fish analyzed by environment the core microbiota is formed by the genera: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Staphylococcus*, *Vibrio* and *Weissella*. On the other hand, the core microbiota found in prebiotic and synbiotic fed fish is composed of the genera:

*Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* and *Thermogemmatispora*. In addition to this analysis of core microbiota, it is noteworthy that the genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Spiroplasma* are present in fish from environments and prebiotics and synbiotics fed fish, bacteria that may have a relevant role in the development of *C. estor*. Analysis of the effect on growth during the experiment, shows that synbiotics treatments significantly improved the length and final body weight, weight gain, weight gain rate, the specific growth rate and condition factor when compared with control and prebiotics treatments. In addition, treatment with prebiotic cell wall significantly increased these values analyzed with respect to control and prebiotic inulin treatments, although it was significantly lower than synbiotics treatments. The relationship analysis of bacteria found with the calculated growth values indicates that the genus *Lactobacillus* is associated with this increased growth. The results of this work show that the microbiota can vary by habitat changes, being more diverse in the wild and reduced in culture, and by influence of prebiotics and probiotics. In addition, genera defined as core microbiota remain despite these changes. These genera present in both wild and cultured fish could be used for isolation or enrichment studies and their application as probiotics in diets for culture fish, and may have a positive effect on the growth of *C. estor* and similar fish species. In addition to this, and based on the results found in terms of growth, it is possible to perform future experiments where cell wall is added as prebiotic with different doses and application times, to determine its effects on growth performance and intestinal microbiota modulation primarily, as a low-cost alternative for management, application and production in terms of processing large quantities of food, compared to supplementation with probiotics and synbiotics.

**Keywords:** Microbiota, habitat, synbiotics, growth, *C. estor*.

### III. ESTRUCTURA DE LA TESIS

El presente trabajo de tesis está organizado en una primera sección donde se encuentra: introducción, hipótesis, objetivos y estrategia metodológica generales. Posteriormente, se presentan dos capítulos los cuales recopilan la información de dos artículos científicos JCR. Posteriormente, se presenta una sección de discusiones y conclusiones generales, para finalizar con cuatro apéndices.

El primer capítulo consiste en el análisis de la microbiota de muestras de digesta e intestinos anterior y posterior de peces blancos en etapa adulta recolectados en el Lago de Pátzcuaro, en tanques con sistema controlado, denominado Cultivo Intensivo y en un estanque de tierra (denomindo Cultivo Extensivo). Mientras que el segundo capítulo versa sobre los efectos de la adición de suplementos prebióticos y simbióticos a la dieta de *C. estor* en cultivo, sobre la microbiota intestinal y el crecimiento de peces blancos juveniles.



#### IV. INTRODUCCIÓN GENERAL

La acuicultura se define como el cultivo de organismos acuáticos (peces, moluscos, crustáceos y algas) tanto en zonas costeras como del interior continental, que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción (FAO 2018). Uno de los objetivos más importantes de esta actividad es el aumento significativo de la producción y la optimización de la rentabilidad (Mohammadian *et al.* 2017). Siguiendo este propósito la acuicultura es, probablemente, el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento y actualmente representa cerca del 50% de la producción pesquera mundial (FAO 2018), ya que en 2016 la acuicultura representó el 47% del total de la producción pesquera que tuvo una producción de 171 millones de toneladas (MT) (FAO 2018). Del 47% de ésta producción (80.37 MT), 54.1 MT fueron del cultivo de peces, 17.1 MT de moluscos, 7.9 MT de crustáceos y 939 mil toneladas de otros animales acuáticos (FAO 2018). Dentro de las especies usadas para acuicultura, en 2016 se registraron en la producción mundial un total de 598 especies, las cuales incluyeron 369 peces de aleta o finos (incluidos cinco híbridos), 109 moluscos, 64 crustáceos, 7 ranas y reptiles, 9 invertebrados acuáticos y 40 algas (FAO 2018).

Dentro de la diversidad de organismos que son usados para acuicultura, es evidente que los peces son el recurso más importante, ya que unos 3,200 millones de personas en todo el mundo dependen del pescado para al menos el 20% de su ingesta de proteínas animales y, además, aproximadamente 20 kg de pescado se consume *per capita* por año (FAO 2018). De este recurso, el registro publicado por la FAO en el año 2018, el continente que mayor producción tuvo, al igual que en todos los años de registro, fue Asia con 47.72 MT. El segundo y tercer lugar de producción fueron América y África con una producción similar de 1.98 y 1.97 MT, respectivamente. En Asia y África los registros indican que la producción de peces ha estado en incremento en la última década. Mientras que en América, en la última década la producción ha tenido altibajos, aunque la producción se ha mantenido estable. Dentro del continente Americano, Chile por sí sólo, representa el 30% de la producción acuícola total (3.35 MT incluyendo peces, moluscos, crustáceos y otras especies acuáticas), el resto de América Latina y el Caribe el 50%, mientras que

América del Norte el restante 20%. En América, México se encuentra posicionado en el 4° lugar de producción acuícola (seguido de Chile, Brasil y Ecuador) con una cantidad de 377,000 toneladas para el año 2016 y un valor de 13,765 millones de pesos (CONAPESCA 2017). La producción acuícola en México está teniendo, al igual que la mayoría de los países en el mundo, una tendencia hacia el crecimiento. La industria acuícola ha ido al alza en los últimos 10 años (FAO 2018). Tal crecimiento está directamente relacionado con el incremento poblacional, el cual se prevé sea de 10,000 millones de personas para el año 2050 (FAO 2018). Por lo tanto, habrá un aumento considerable en el requerimiento de alimentos provenientes de esta actividad. Para soportar la demanda actual y futura, se han implementado condiciones de producción intensiva, que han causado situaciones de alto estrés en los organismos cultivados. A su vez, esto se relaciona con la reducción en la calidad del agua y la incidencia de enfermedades provocadas por infecciones virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias, las cuales provocan mortalidades masivas y pérdidas millonarias a nivel mundial (Murray y Peeler 2005, Mennerat *et al.* 2010, Kurath y Winton 2011, Hussein *et al.* 2013, Van den Berg *et al.* 2013, Sundberg *et al.* 2016, Tavares-Dias y Martins 2017). Además, la aplicación indiscriminada de antibióticos para tratar de mitigar enfermedades de origen bacteriano y/o utilizados como promotores de crecimiento, son en muchas ocasiones generadores de resistencia a antibióticos que resulta en un alto riesgo para la salud, tanto de los organismos cultivados, como para los consumidores finales (Cabello 2006, FAO 2006, FAO 2018, Guangxin *et al.* 2022). Una alternativa viable de mejora en la acuicultura, ha sido el uso de suplementos como prebióticos, probióticos y simbióticos adicionados como parte de la dieta de los distintos organismos acuáticos (crustáceos y peces).

Los prebióticos han sido definidos como sustratos utilizados selectivamente por microorganismos que están en el hospedero y que confieren un beneficio a su salud (Gibson *et al.* 2017). En la actividad acuícola, los prebióticos más utilizados han sido los  $\beta$ -glucanos (Vetvicka *et al.* 2013, Ghaedi *et al.* 2015, Cao *et al.* 2019), la inulina (Mahious *et al.* 2006, Hoseinifar *et al.* 2015, Tiengtam *et al.* 2015, Oliveira *et al.* 2020), los mananooligosacáridos (MOS) (Torrecillas *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2010,

Hoseinifar *et al.* 2015, Hahor *et al.* 2019) y la pared celular proveniente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Hoseinifar *et al.* 2011, Abu-Elala *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2020). Se ha determinado que los distintos prebióticos pueden ser metabolizados por bacterias ácido lácticas como *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., las cuales pueden estar presentes en el tracto digestivo del hospedero, donde forman ácidos grasos de cadena corta que pueden ser absorbidos por el mismo, y de esta forma utilizarse como fuentes de energía (Guerreiro *et al.* 2017).

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas (al menos  $10^6$ - $10^7$  unidades formadoras de colonia por gramo de alimento; UFC/g), proporcionan beneficios al hospedero (FAO y OMS 2006). Los organismos comúnmente usados como probióticos en acuicultura son bacterias como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Carnobacterium*, *Roseobacter* y hongos como *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus* y *Aspergillus fungus* (Robertson *et al.* 2000; Vinderola y Reinheimer 2003, Ringø *et al.* 2010, Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro 2010, Castro *et al.* 2013, Standen *et al.* 2013, Ayo Olalusi 2017, Dawood *et al.* 2019, Kong *et al.* 2020, Ghanei-Motlagh *et al.* 2021). Además, como una alternativa de estos prebióticos y probióticos, existe la combinación de al menos un microorganismo probiótico y una sustancia prebiótica, los llamados simbióticos (del inglés synbiotic), cuyos efectos son superiores que cuando son ofrecidos de manera individual (Cerezuela *et al.* 2011, Hasan *et al.* 2018, Lee *et al.* 2018, Rahimnejad *et al.* 2018).

Los distintos prebióticos, probióticos y sus combinaciones como simbióticos se han aplicado con éxito en el cultivo de peces, con resultados positivos en el crecimiento, la supervivencia, la estimulación del sistema inmune, el incremento de la producción de enzimas digestivas y bactericidas, así como modulación de la morfología intestinal (Anexo 1). Además, se ha visto que estos suplementos tienen una modulación efectiva sobre la microbiota intestinal, con reducción de bacterias patógenas e incremento de bacterias potencialmente benéficas como las ácido lácticas (Anexo 1). Por lo tanto, en estudios de alimentación y nutrición es importante estudiar la

microbiota para definir cuáles microorganismos están presentes y la relación que pueden tener con el organismo hospedero.

La microbiota se define como la comunidad colectiva de microorganismos (principalmente bacterias, seguido de archaea, levaduras, protozoarios y virus) que habita en un ecosistema o entorno específico (piel, tracto gastrointestinal, agua, suelo) (Nayak 2010, Tremaroli y Backhed 2012, Gibson *et al.* 2017). En peces, se ha establecido que la microbiota intestinal cumple funciones importantes como protección contra patógenos, mejoramiento del sistema inmune, así como la síntesis de metabolitos que pueden estar disponibles para ser adquiridos como nutrientes por el hospedero, para crecer y desarrollarse adecuadamente (Nayak 2010, Dehler *et al.* 2016, Guangxin *et al.* 2022).

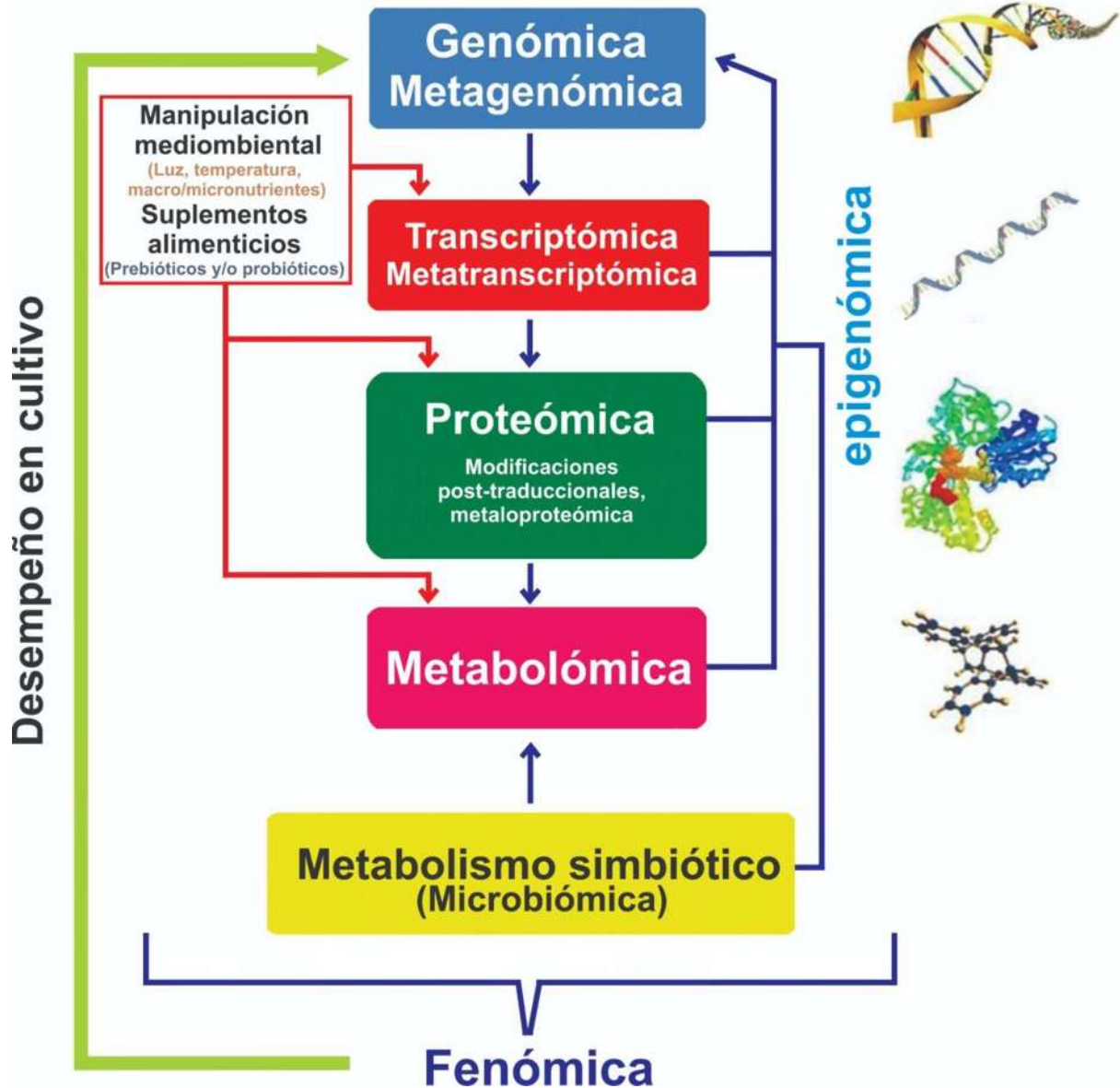
La microbiota es influenciada por factores como el hábitat, etapa de desarrollo del hospedero, dieta y parámetros ambientales (Miyake *et al.* 2015, Gajardo *et al.* 2016, Ringø *et al.* 2016, Egerton *et al.* 2018), así como por la aplicación de suplementos prebióticos y probióticos (Ringø *et al.* 2016, Anexo 1), por lo anterior, la microbiota puede ser definida como autóctona, alóctona y “core”. La microbiota autóctona o también conocida como indígena o residente, se define como los microorganismos que están regularmente presentes en el hospedero, adheridos al epitelio y a la mucosa intestinal (Gajardo *et al.* 2016, Ringø *et al.* 2016, Gómez-Gil *et al.* 2017). Mientras que, la microbiota alóctona o transitoria, son los microorganismos que están eventualmente presentes en el hospedero, como parte de la digesta, en el lumen intestinal y después como parte de las heces, porque no pueden colonizar la mucosa y la superficie epitelial (Gajardo *et al.* 2016, Ringø *et al.* 2016, Gómez-Gil *et al.* 2017). En cuanto a la “core” microbiota, aún no existe una definición consenso que sea utilizada ampliamente, ya que en algunos trabajos la definen como géneros similares de la microbiota del intestino de la misma o diferentes especies de peces con funciones que incrementan la digestión, la disponibilidad de nutrientes y el sistema inmune (Roeselers *et al.* 2011, Ghanbari *et al.* 2015). Mientras que otros autores la definen como la presencia de géneros en un número considerable de muestras analizadas por grupo de estudio y que va desde, al menos, el 80% hasta la totalidad

de las muestras (Baldo *et al.* 2015, do Vale-Pereira *et al.* 2017, Sweet y Bulling 2017, Rimoldi *et al.* 2019).

Para entender de forma apropiada los diferentes efectos del uso de suplementos prebióticos, probióticos y simbióticos, en la actualidad resulta imperativa la aplicación de la llamada biología de sistemas, que consiste en el estudio de los organismos vivos a través de las ciencias ómicas: Genómica, Metagenómica, Transcriptómica, Metatranscriptómica, Proteómica, Metabolómica, Fenómica y Epigenética (Fig. 1). Sin embargo, el costo de las distintas herramientas para procesamiento y análisis bioinformático resulta elevado, por lo que muchas investigaciones se enfocan en estudiar algunas de ellas y no todo el conjunto. En el presente trabajo se ha aplicado la metagenómica, la cual se define como el estudio de la información genética que está contenida en todos los microorganismos que se encuentran en una comunidad o entorno natural sin necesidad de aislar y cultivar en laboratorio las especies individuales (Chen y Pachter 2005, Tremaroli y Bäckhed 2012).

### **Importancia del pescado blanco *Chirostoma estor***

La creciente demanda de pescado por parte de la población mundial debe ser satisfecha por la producción de la acuicultura, de tal forma que se permita a las poblaciones de peces sobreexplotadas reponerse. En comparación con los animales de granja, los peces son una fuente rica de proteínas de alta calidad, micronutrientes como fósforo, hierro y selenio, vitaminas y sobretodo, ácidos grasos esenciales omega 3 (Tacon y Metian 2013, FAO 2016).



**Figura 1.** Ciencias ómicas y su interacción. (Basada en Horgan y Kenny, 2011 y publicada en Martínez-Chávez *et al.* 2022)

A pesar de que el pez blanco *Chirostoma estor* es una especie de agua dulce, se ha descubierto que tiene la capacidad de reconvertir el ácido alfa linolénico ( $18:3\omega3$ ) por medio de una ruta metabólica corta con la enzima  $\Delta4$  en DHA (ácido docosahexaenoico  $22:6\omega3$ ), al igual que peces marinos como el lenguado *Solea senegalensis* y el sigano pintado *Siganus canaliculatus* (Martínez-Palacios *et al.* 2006, Fonseca-Madriral *et al.* 2014, Morais *et al.* 2015, You *et al.* 2017). Por lo tanto,

consumir pescado blanco es importante en la alimentación humana, ya que una dieta rica en DHA genera beneficios fisiológicos en la presión arterial, la frecuencia cardiaca, el desarrollo fetal, el desarrollo del cerebro y la retina (FAO 2010). En el pez blanco dentro de todos los lípidos que posee, del 21-31% es DHA, lo que lo clasifica como una especie nutracéutica (Martínez-Palacios *et al.* 2006, Martínez-Palacios *et al.* 2020).

También, esta especie es considerada de alta importancia ecológica por estar en un nivel bajo de la cadena trófica, ya que es un consumidor de zooplancton (Ross *et al.* 2006, Martínez-Palacios *et al.* 2019). Otra particularidad de esta especie es que puede considerarse como un modelo biológico, debido a que pertenece a un grupo de especies que poseen un intestino corto y carecen de estómago. Los estudios que se le han realizado en esta especie pueden ser de utilidad para diversos trabajos en otras especies con potencial acuícola, de las que se sabe poco y que también presentan estas características anatómicas.

El pescado blanco se encuentra en peligro debido a la pérdida de su hábitat a causa de la contaminación y asolvamiento de la cuenca de Pátzcuaro y Zirahuén de donde este pez es originario (Martínez-Palacios *et al.* 2006). Además, esta especie tiene competencia por espacio y alimento debido a la introducción desmedida de especies exóticas carnívoras. Aunado a esto, este recurso se ha sobreexplotado los últimos 30 años (INAPESCA 2013) ya que goza de amplia demanda local y regional, que actualmente es insatisfecha. Por lo anterior, en los últimos 20 años se ha realizado el cultivo controlado de este recurso en la UMSNH, obteniéndose resultados excelentes al manejar todo el ciclo de vida de este pez. Sin embargo, aún no se han logrado resultados a nivel comercial, ya que esta especie es considerada de lento crecimiento.

Debido al requerimiento que tiene la humanidad de integrar en su dieta alimentos con alto valor nutricional (proteína y DHA) que el pescado blanco puede suministrar, actualmente alcanza altos precios en el mercado local (desde 300 a 1,200 pesos por kilogramo), lo cual lo está orillando a la extinción. Por ello, resulta importante lograr una acuicultura comercial que permita producir este producto de alta calidad para la

alimentación humana y permitir una recuperación de la especie en los lagos Michoacanos.

Una de las alternativas que se propone para mejorar las condiciones de cultivo e incrementar significativamente la producción de esta especie, puede ser la administración de prebióticos, probióticos y simbióticos como parte de la dieta base que tienen los peces juveniles y adultos, que se encuentran en sistemas controlados de cultivo y con ello, poder determinar la influencia de estos suplementos en el desempeño y en la modulación de la microbiota intestinal de esta importante especie. Sin embargo, para determinar claramente la influencia que puedan tener estos suplementos en la microbiota, es adecuado conocer primero cuál es la microbiota normal (línea base) de esta especie, tanto en condiciones silvestres como controladas. Es por ello, que el presente trabajo se ha dividido en dos capítulos, para primeramente evaluar la microbiota intestinal de peces blancos *Chirostoma estor* adultos presentes en tres ambientes diferente de desarrollo. Mientras que en el segundo capítulo, se ha realizado un experimento adicionando suplementos prebióticos y simbióticos a dietas de peces blancos juveniles para determinar su influencia sobre el crecimiento y la modulación de la microbiota intestinal de esta especie. Además, se ha realizado análisis para predecir las bacterias moduladas por estos suplementos que pueden contribuir en la mejora del crecimiento.



## V. HIPÓTESIS GENERAL

La microbiota intestinal del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* es modulada por el ambiente y por la adición de prebióticos y simbióticos a la dieta, influyendo también en el crecimiento de los peces.

### V.1 Hipótesis capítulo 1

1. La diversidad bacteriana del intestino de peces blancos adultos en medio silvestre (Lago de Pátzcuaro) es mayor que la de los peces provenientes del cultivo intensivo controlado.
2. Existen bacterias que permanecen en el intestino de peces de todos los ambientes (core microbiota).

### V.2 Hipótesis capítulo 2

1. La adición de prebióticos y simbióticos en la dieta de peces blancos juveniles mejora el crecimiento.
2. Los prebióticos y simbióticos aplicados a la dieta de peces blancos juveniles modulan la presencia de bacterias intestinales, en especial las bacterias ácido lácticas.
3. Existe la presencia de una “core” microbiota en el intestino de peces de todos los tratamientos prebióticos y simbióticos, incluido el testigo.

## VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del ambiente sobre la microbiota intestinal de peces blancos adultos *Chirostoma estor*, y los efectos de la adición dietética de prebióticos y simbióticos sobre la microbiota intestinal y el crecimiento de peces juveniles.

## VII. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### VII.1 Microbiota en ambientes de desarrollo del pez blanco

#### VII.1.1 Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de peces blancos adultos del medio silvestre y del cultivo intensivo los días 22 de marzo y 10 de mayo de 2018, respectivamente. Las muestras de medio silvestre fueron recolectadas en el Lago de Pátzcuaro (LP). Mientras que las muestras de peces en cultivo intensivo fueron recolectados en la planta de cultivo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la UMSNH en San Juanito Itzícuaru (C). Se recolectaron 13 peces del lago y 20 del cultivo intensivo. Adicionalmente, se recolectaron 19 peces blancos adultos de un estanque de tierra al que denominamos cultivo extensivo (E), el cual es alimentado con agua de lluvia y agua proveniente de los tanques donde se encontraban los peces de cultivo intensivo.

Inmediatamente después de las colectas, los peces fueron anestesiados introduciéndolos en agua a 4 °C, para posteriormente limpiar la superficie ventral de los peces con alcohol al 70% y de inmediato ser diseccionados, removiendo el tejido que rodea la grasa visceral y el total del intestino se separó en intestino anterior y posterior, con pinzas estériles y con ayuda de un bisturí nuevo y estéril. Se separó la digesta (D) del intestino en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril con etanol al 96%. Después se hizo corte a medio intestino (corte transversal) para separar el intestino anterior del intestino posterior, enseguida se colocaron las dos partes del intestino en dos tubos Eppendorf estériles con etanol al 96%. Una vez obtenidas las muestras, estas se almacenaron en refrigeración a 4 °C. La digesta (D), intestino anterior (A) e intestino posterior (P), obtenidos de los peces se denominaron como componentes intestinales. En la Fig. 2 se presenta una visualización de estas regiones del intestino.



**Figura 2.** Componentes del intestino del pez blanco *Chirostoma estor* separados en digesta, intestino anterior e intestino posterior.

Durante la toma de muestras de los peces blancos recolectados en el Lago de Pátzcuaro (LP), Cultivo Intensivo (C) y Cultivo Extensivo (E), se tomaron datos del sexo, peso y talla, así como del peso y tamaño del intestino total (incluyendo digesta e intestinos anterior y posterior) de cada pez recolectado y procesado (Anexo 2).

#### **VII.1.2 Extracción de ADN y análisis bioinformático**

Se realizó la extracción del ADN de muestras de digesta (24), intestino anterior (25) e intestino posterior (25) de adultos de pez blanco *Chirostoma estor* de los tres ambientes, mediante el método CTAB (Doyle y Doyle 1987) (Anexo 3).

Una vez realizada la extracción de ADN, las distintas muestras se procesaron para realizar la secuenciación por Illumina Miniseq en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Mazatlán. Los datos de la secuenciación se procesaron y analizaron por la metodología presentada en el sub-apartado “Bioinformatics” de “Materials & Methods” del primer artículo correspondiente a este capítulo 1. Se realizó anotación taxonómica de bacterias por la base de datos de SILVA versión 138.

#### **VII.1.3 Análisis estadístico y predicción funcional por PICRUSt2**

Se realizó un análisis estadístico de los datos generados de la bioinformática en función de la alfa y beta diversidad, así como de la presencia y abundancia bacteriana en los niveles Phyla y géneros. Además, se realizó análisis de predicción de perfiles metabólicos de los datos provenientes de la secuenciación (gen RNAr 16S) usando la herramienta PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities

by Reconstruction of Unobserved States 2). Todos estos análisis se presentan de forma más amplia en el subapartado “Statistical analysis” y “Predictive functional analysis by PICRUST2” de “Materials & Methods” del primer artículo correspondiente a este capítulo 1.

## VII.2 Experimento de adición de prebióticos y simbióticos

### VII.2.1 Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en la planta de cultivo de pez blanco del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) Morelia, México. Los peces blancos *Chirostoma estor* (2,070 juveniles de 7 meses de edad) se adaptaron a condiciones experimentales durante 2 semanas y se alimentaron con una dieta basal (Tabla 1) durante el período de aclimatación.

**Tabla 1.** Ingredientes que componen la dieta basal de *Chirostoma estor*.

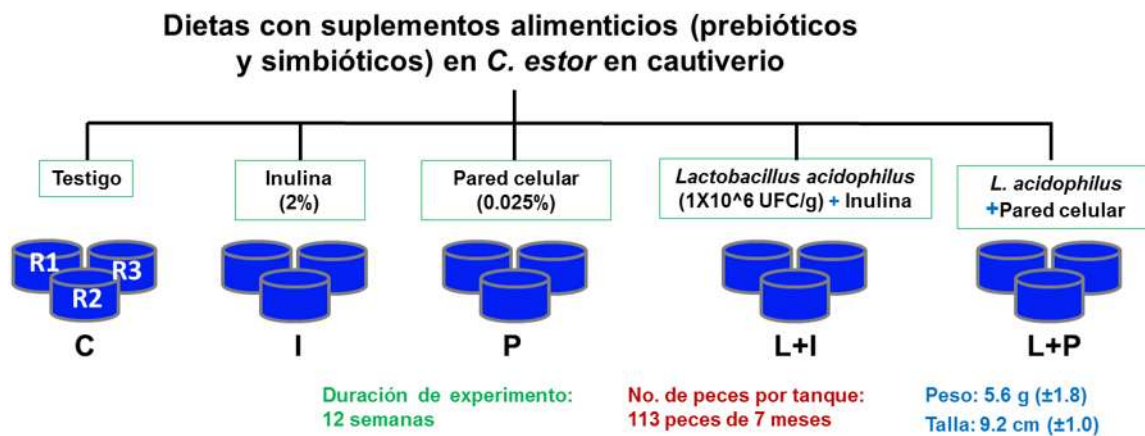
Ingrediente (g/kg)	Dieta basal
Fuentes de proteínas marinas <sup>1</sup>	423.11
Fuentes de proteínas solubles <sup>2</sup>	199.20
Aislado de proteína de soya	57.97
Aceite de canola	3.89
Almidón de maíz	251.00
BHT (antioxidante)	0.50
Lecitina de soya	19.30
Premezcla de vitaminas <sup>3</sup>	15.00
Goma arábica	18.00
Alginato de sodio	2.00
Vitamina C <sup>3</sup>	3.40
Taurina	10.00
Colina <sup>3</sup>	3.00
Premezcla de microminerales <sup>3</sup>	15.00
Premezcla de macrominerales <sup>3</sup>	10.00

<sup>1</sup>Fuentes de proteínas marinas: Harina de pescado, harina de Krill

<sup>2</sup>Fuentes de proteínas solubles: Albúmina de huevo, suero de leche, caseinato de calcio

<sup>3</sup>Fuente de vitaminas y minerales proporcionados por: DSM Nutritional products

Previo al inicio del experimento, se tomó una muestra representativa de la población al 95% de confianza (324 peces) para determinar los datos de talla y peso. La talla y peso promedio fueron de  $9.2 \pm 1.0$  cm y  $5.6 \pm 1.8$  g respectivamente (Anexo 4). De esta población de peces, algunos se tomaron para realizar estudios de composición proximal y otros para analizar microbiota inicial. Se distribuyeron 1,695 peces al azar en tanques circulares con capacidad de ~7000 L (3 m diámetro x 1 m altura) en cinco tratamientos (3 tanques/tratamiento; 113 peces/tanque) (Fig. 3). La distribución de los tanques de todos los tratamientos y sus réplicas se realizó al azar, se proporcionó aireación continua a cada tanque usando piedras aireadoras que estaban conectadas a un compresor de aire central. Los siguientes parámetros de calidad del agua se midieron y registraron diariamente: la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y el oxígeno disuelto (mg/L). Durante el experimento, los peces se alimentaron manualmente *ad libitum* 6 veces al día por 9 horas durante 12 semanas. Los peces fueron mantenidos a una temperatura entre 16 y 24  $^{\circ}\text{C}$ , y una oxigenación entre 3.70 y 4.98 mg/L. La limpieza de los tanques se realizó cada 7-10 días.



**Figura 3.** Esquema del diseño experimental y dosis de prebióticos y simbióticos aplicados a las dietas de los peces blancos *Chirostoma estor*.

## VII.2.2 Preparación de las dietas

Antes de iniciar la preparación de las distintas dietas, se realizaron los análisis proximales de los ingredientes que la conforman, dichos análisis para la formulación de las dietas están presentados en la tabla del Anexo 5.

En este experimento, se utilizó una dieta basal (tratamiento testigo, C) diseñada y preparada en la planta de cultivo del pez blanco del IIAF de la UMSNH; dos prebióticos: inulina (I) extraída de agave *Agave tequilana* (Transformación e Innovación S.A. de C.V., yuxi) y pared celular (P) (rica en Mananooligosacáridos, MOS; min. 22% y  $\beta$ -glucanos min. 24%) obtenida por autólisis de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (SafMannan®, Safmex S.A. de C.V.); una combinación simbiótica (synbiotics) de *Lactobacillus acidophilus* LA-14® + inulina (L+I); y una combinación simbiótica de *L. acidophilus* LA-14® + pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* constituida por MOS y  $\beta$ -glucanos marca SAFMANNAN® (L+P). *L. acidophilus* se aplicó a la dieta basal como suplemento en forma de pellet (5 g/kg de dieta) logrando una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/g al finalizar la preparación de la dieta. La inulina se agregó como suplemento a la dieta basal en una cantidad de 20 g/kg (2%). La pared celular también se adicionó a la dieta basal en una cantidad de 0.25 g/kg (0.025%). La combinación simbiótica de *L. acidophilus* más el respectivo prebiótico (inulina o pared celular) se aplicaron en la misma cantidad que la agregada por separado en la dieta correspondiente ( $1 \times 10^6$  UFC/g) (Table 1 subsección “Proximate composition analysis” de “Materials and Methods” del borrador del segundo artículo científico referente a este capítulo 2). Todos los ingredientes de las dietas de cada tratamiento, se mezclaron completamente y luego se pasaron por un molino de carne marca “Hobart” para producir “churros” en frío (4 mm de diámetro) y se colocaron en un secador de aire forzado con una temperatura de entre 25 y 30 °C por 24 horas hasta obtener las dietas con aproximadamente un 10% de humedad. Después del secador de aire forzado, los churros se llevaron a un molino y manualmente se quebraron en pellets de tamaño adecuado para el consumo por los peces (1-2 mm). Enseguida, los pellets se colocaron en bolsas plásticas selladas y se almacenaron a -20 °C para su uso durante el experimento (metodología seguida por Akter *et al.*, 2019). Una vez preparadas cada una de las dietas, se les realizó una

prueba de la composición proximal (Table 1 subsección “Proximate composition analysis” de “Materials and Methods” del borrador del segundo artículo científico referente a este capítulo 2). Además, a las dietas de los tratamientos simbióticos (*Lactobacillus* + inulina y *Lactobacillus* + pared celular) se les realizó pruebas periódicas (1, 5, 9 y 12 semanas) de viabilidad de *Lactobacillus* (cultivo en agar MRS; Man, Rogosa y Sharpe) con el fin de verificar si estas dietas experimentales contenían bacterias probióticas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Pruebas de viabilidad de *L. acidophilus* en los tratamientos simbióticos durante el experimento. **Nota:** Se realizó el cultivo de la dieta testigo como blanco y no se encontró crecimiento bacteriano.

Tratamiento	1ª semana	5ª semana	9ª semana	12ª semana
<i>L. acidophilus</i> + inulina	2.45 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	2.1 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1.6 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1.3 x 10 <sup>6</sup> UFC/g
<i>L. acidophilus</i> + pared celular	2.65 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	2.2 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1.8 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1.4 x 10 <sup>6</sup> UFC/g
Testigo	0.0 UFC/g	0.0 UFC/g	0.0 UFC/g	0.0 UFC/g

### VII.2.3 Colecta de muestras y análisis

Al final del experimento (12 semanas), 20 peces por tanque (3 réplicas) de cada tratamiento fueron medidos y pesados individualmente. Inmediatamente, la cavidad abdominal de cada pez fue disectada bajo condiciones asépticas, el intestino fue extraído y colocado en tubos estériles con etanol al 96% y almacenado a 4 °C hasta la extracción de ADN. Todos los especímenes fueron tratados de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE para la experimentación con animales y las directrices para el alojamiento y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (2007/526/CE).

Durante el procesamiento de las muestras de peces blancos del experimento, se tomaron datos del sexo, peso y talla del pez, peso y tamaño del intestino total, así como de peso del hígado y uso de la muestra de cada pez recolectado y procesado (Anexo 6).



#### VII.2.4 Análisis de composición proximal

De los peces procesados durante el muestreo, se tomaron tres peces por cada réplica y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizó el análisis de composición proximal. Los análisis fueron realizados de acuerdo al método estándar de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (Association of Official Analytical Chemists, AOAC 2000). La humedad se determinó secando las muestras por 12 horas en una estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ . El contenido en cenizas se estimó incinerando las muestras ( $\sim 1.0$  g) en un horno de mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  durante 8 h. El contenido en lípidos de las muestras ( $\sim 1.0$  g) se determinó por el método de extracción Soxhlet. El nitrógeno proteico ( $\text{N} \times 6,25$ ) se determinó incinerando las muestras ( $\sim 0.1$  g) por el método Dumas. Los resultados de estos análisis están en Table 2 subsección “Carcass composition” de “Results” del borrador del segundo artículo científico referente a este capítulo 2).

#### VII.2.5 Rendimiento de crecimiento y tasa de supervivencia

Para evaluar el rendimiento de crecimiento de los peces y la utilización del alimento, se calcularon los siguientes índices: longitud total (FBL, cm), peso final (FBW, g), ganancia de peso (WG, g) = (peso final - peso inicial), porcentaje ganancia de peso (WGR,%) =  $100 \times [(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}]$ , tasa de crecimiento específico (SGR) =  $100 \times [(\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})) / \text{días}]$ , factor de condición (CF) =  $100 \times (\text{peso, g}) / (\text{longitud total, cm})^3$ , tasa de conversión alimenticia (FCR) =  $\text{ingesta de alimento (g)} / \text{ganancia de peso (g)}$ , eficiencia alimenticia (FE) =  $\text{ganancia de peso (g)} / \text{ingesta de alimento (g)}$ . Para calcular la tasa de supervivencia se utilizó la siguiente ecuación:  $\text{supervivencia (\%)} = 100 \times (\text{número final de peces} / \text{número inicial de peces})$ . Los resultados de estos análisis están en Table 3 subsección “Growth performance” de “Results” del borrador del segundo artículo científico referente a este capítulo 2).

### VII.2.6 Extracción de ADN y análisis bioinformático

Se realizó extracción del ADN de un número representativo de muestras de intestino de los cinco tratamientos (Testigo, 8; Inulina, 8; Pared celular, 9; *Lactobacillus* + inulina, 8; *Lactobacillus* + pared celular, 9) mediante el método CTAB (Doyle y Doyle 1987) (Anexo 3).

Una vez realizada la extracción de ADN, las distintas muestras se procesaron para enviar y realizar la secuenciación por Illumina Miniseq en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Mazatlán. Los datos de la secuenciación se procesaron y analizaron por la metodología presentada en el subapartado “Bioinformatics” de “Materials and Methods” del segundo artículo correspondiente a este capítulo 2. Se realizó la anotación taxonómica de bacterias mediante la base de datos SILVA versión 138.

### VII.2.7 Análisis estadístico y predicción funcional por PICRUST2

Se realizó un análisis estadístico de los datos generados del análisis bioinformático en función de la alfa y beta diversidad, así como de la presencia y abundancia bacteriana en los niveles Phyla y géneros. Además, se realizó un análisis de predicción de perfiles metabólicos de los datos provenientes de la secuenciación (gen RNAr 16S), usando la herramienta PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2, Douglas *et al.* 2019). Todos estos análisis se presentan de forma más amplia en el subapartado “Statistical analysis” y “Predictive functional analysis by PICRUST2” de “Materials and Methods” del segundo artículo correspondiente a este capítulo 2.

## CAPÍTULO 1

### Microbiota intestinal de *Chirostoma estor* adulto en ambiente silvestre (Lago de Pátzcuaro) y ambientes de cultivo intensivo y extensivo.

#### Resumen

Los peces son el grupo más diverso de vertebrados con distintas estructuras anatómicas y estrategias digestivas, por lo que se conocen diversos tipos de interacciones entre el hospedero y su microbiota. Estudios en peces han demostrado que las diferentes bacterias que componen la microbiota pueden contribuir o afectar su desarrollo. En general, faltan estudios sobre los mecanismos digestivos y la microbiota de peces agástricos de intestino corto, por lo que hay poca información sobre el impacto que los cambios en la diversidad de la microbiota intestinal podrían tener en la salud de estos peces. Para coadyuvar a este conocimiento, en el presente capítulo se estudia el pez blanco del Lago de Pátzcuaro *Chirostoma estor* como un modelo biológico agástrico y de intestino corto, con la finalidad de observar la diversidad y el potencial metabólico de su microbiota intestinal. Esta microbiota se caracterizó usando secuenciación de alto rendimiento de la región V3 del gen de rRNA 16S. Se tomaron muestras de componentes intestinales (digesta, intestino anterior y posterior) de peces de tres ambientes diferentes (silvestre Lago, cultivo intensivo y cultivo extensivo). En los resultados destaca que la diversidad microbiana intestinal es significativamente mayor en peces silvestres que en cultivados, lo que sugiere una pérdida de diversidad cuando los peces se crían en entornos controlados. Los Phyla bacterianos en estos ambientes fueron Firmicutes y Proteobacteria, y dentro de estos, los géneros *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Spiroplasma* y *Aeromonas* fueron los más abundantes. Aunque hubo variación de la microbiota entre ambientes, 133 OTUs fueron encontradas en todos los ambientes y componentes intestinales, entre estos OTUs identificados destacan los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Spiroplasma* como parte de la core microbiota *C. estor*. Estos resultados proporcionan por primera vez, información sobre las bacterias presentes en un pez agástrico de intestino corto con potencial acuícola-comercial.

**Palabras clave:** Microbiota intestinal, *C. estor*, ambientes, Lago, cultivo.

**Objetivos específicos capítulo 1**

1. Evaluar el efecto del cambio de ambiente silvestre a condiciones de cultivo controlado sobre la microbiota intestinal de peces adultos de *Chirostoma estor*.
2. Definir la presencia de “core” microbiota en peces adultos de *Chirostoma estor*.

**CAPÍTULO 1****Título del artículo científico:**

**Loss of gut microbial diversity in the cultured, agastric fish, Mexican pike silverside (*Chirostoma estor*: Atherinopsidae)**

Trabajo publicado en la revista PeerJ.

Amillano-Cisneros JM, Hernández-Rosas PT, Gomez-Gil B, Navarrete-Ramírez P, Ríos-Durán MG, Martínez-Chávez CC, Johnston-Monje D, Martínez-Palacios CA, Raggi L. 2022. Loss of gut microbial diversity in the cultured, agastric fish, Mexican pike silverside (*Chirostoma estor*: Atherinopsidae). PeerJ 10:e13052 <http://doi.org/10.7717/peerj.13052>



# Loss of gut microbial diversity in the cultured, agastric fish, Mexican pike silverside (*Chirostoma estor*: Atherinopsidae)

Jesús Mateo Amillano-Cisneros<sup>1</sup>, Perla T. Hernández-Rosas<sup>1</sup>, Bruno Gomez-Gil<sup>2</sup>, Pamela Navarrete-Ramírez<sup>1,3</sup>, María Gisela Ríos-Durán<sup>1</sup>, Carlos Cristian Martínez-Chávez<sup>1</sup>, David Johnston-Monje<sup>4</sup>, Carlos Antonio Martínez-Palacios<sup>1</sup> and Luciana Raggi<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Mazatlán, Sinaloa, Mexico

<sup>3</sup>Cátedras-CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Max Planck Tandem Group in Plant Microbial Ecology, Universidad del Valle, Cali, Valle del Cauca, Colombia

## ABSTRACT

Teleost fish are the most diverse group of extant vertebrates and have varied digestive anatomical structures and strategies, suggesting they also possess an array of different host-microbiota interactions. Differences in fish gut microbiota have been shown to affect host development, the process of gut colonization, and the outcomes of gene-environment or immune system-microbiota interactions. There is generally a lack of studies on the digestive mechanisms and microbiota of agastric short-intestine fish however, meaning that we do not understand how changes in gut microbial diversity might influence the health of these types of fish. To help fill these gaps in knowledge, we decided to study the Mexican pike silverside (*Chirostoma estor*) which has a simplified alimentary canal (agastric, short-intestine, 0.7 gut relative length) to observe the diversity and metabolic potential of its intestinal microbiota. We characterized gut microbial populations using high-throughput sequencing of the V3 region in bacterial 16S rRNA genes while searching for population shifts resulting associated with fish development in different environments and cultivation methods. Microbiota samples were taken from the digesta, anterior and posterior intestine (the three different intestinal components) of fish that grew wild in a lake, that were cultivated in indoor tanks, or that were raised in outdoor ponds. Gut microbial diversity was significantly higher in wild fish than in cultivated fish, suggesting a loss of diversity when fish are raised in controlled environments. The most abundant phyla observed in these experiments were Firmicutes and Proteobacteria, particularly of the genera *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Spiroplasma*, and *Aeromonas*. Of the 14,161 OTUs observed in this experiment, 133 were found in all groups, and 17 of these, belonging to *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, and *Spiroplasma* genera, were found in all samples suggesting the existence of a core *C. estor* microbiome. Functional metagenomic prediction of bacterial ecological functions using PICRUSt2 suggested that different intestinal components select for functionally distinct microbial populations with variation in pathways related to the metabolism of amino acids, vitamins, cofactors, and energy. Our results provide, for the first time,

Submitted 28 September 2021

Accepted 12 February 2022

Published 7 March 2022

Corresponding author

Luciana Raggi,  
luciana.raggi@umich.mx,  
luciana.raggi@gmail.com

Academic editor

Khor Waiho

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 14

DOI 10.7717/peerj.13052

© Copyright

2022 Amillano-Cisneros et al.

Distributed under  
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

information on the bacterial populations present in an agastric, short-gut teleost with commercial potential and show that controlled cultivation of this fish reduces the diversity of its intestinal microbiota.

**Subjects** Aquaculture, Fisheries and Fish Science, Biodiversity, Ecology, Microbiology

**Keywords** Environmental metagenomics, Microbe:higher organism interactions, Microbial communities, Microbial ecology, Microbe-fish symbiosis

## INTRODUCTION

Gut microbiota, defined as the collective community of microorganisms that inhabit the intestine, are known to contribute to host physiology like digestion, nutrient absorption, and immune system function, significantly impacting animal health, welfare, growth, and behavior (reviewed by [Douglas, 2019](#)). In fish, the density, composition, and function of intestinal microbial communities are influenced by internal and external factors, including genotype, life stage, trophic level, diet, season, habitat (chemical and physical factors), sex, and phylogeny (reviewed by [Butt & Volkoff, 2019](#)). It is estimated that the fish gut contains between  $10^7$  and  $10^{11}$  bacterial cells per gram of intestinal content, and these microbes can be either residents or transients ([Nayak, 2010](#); [Navarrete et al., 2012](#)). A total of about 145 different teleost fish species have been involved in microbiome studies, including the zebrafish model and other important fish for commercial aquaculture ([Perry et al., 2020](#)).

Teleosts are the most diverse group of vertebrates, occupying many different habitats, employing many varied feeding strategies, and possessing distinctive digestive specializations/anatomical configurations, which has resulted in their having a wide array of host-microbiota interactions ([Lescak & Milligan-Myhre, 2017](#)). For example, some agastric fish like cyprinids compensate for their lack of stomach-based acid digestion by increasing the length of their intestines and presumably depend to a greater extent on microbial activity to help break down their food ([Manjakasy et al., 2009](#); [Egerton et al., 2018](#)). Little is known about the microbiota of agastric short-intestine teleosts lacking a true stomach, except for the zebrafish model species *Danio rerio*, which is an agastric short-intestine species of no commercial value. The study of microbial community dynamics in both wild and controlled environments studies is relatively simple with teleosts because in captivity, most fish species develop rapidly and in high quantities ([Lescak & Milligan-Myhre, 2017](#)). Such studies have previously demonstrated that gut microbiome composition affects host development, the process of microbiome colonization and succession, and gene-environment or immune system-microbiota interactions (reviewed by [Nayak, 2010](#); [Butt & Volkoff, 2019](#)). As omics techniques (metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics, and metabolomics) continue to be developed and improved, our ability to study the ecology and function of fish microbiota is likewise evolving.

To help fill in the knowledge gap about the importance and function of agastric fish gut microbiota, we propose studying the Mexican pike silverside, *Chirostoma estor* due to its simplified digestive tract lacking a stomach and consisting instead of a short-intestine that is only 0.7 the fish's length (relative gut length - rgl) ([Ross et al., 2006](#)). The Mexican

pike silverside has been described by the FAO of the United Nations, as a species with high aquaculture potential due to its regional importance, low trophic level, and high nutraceutical value (high docosahexaenoic acid (DHA) content) (Fonseca-Madrigal et al., 2014; Martínez-Palacios et al., 2019; Martínez-Palacios et al., 2020). This teleost fish consumes mostly zooplankton and insects, which are finely ground by chewing before swallowing (Ross et al., 2006; Martínez-Palacios et al., 2019). Due to its simplified intestinal configuration, we hypothesize that the Mexican pike silverside is likely to depend more heavily on its gut microbiota for aid in digestion and nutrient absorption, compared to teleosts with stomachs or more sophisticated digestive systems. If we are to successfully develop methods of aquaculture for agastric fish such as the Mexican pike silverside, it will be important to better understand how their intestinal microbiomes are established, how these microbes influence their health and nutrition, and what conditions are necessary to optimize the interactions between bacteria and host.

In this study, we analyze and compare the gut microbiomes of *C. estor* harvested from a wild environment (Lake Patzcuaro), cultivated in indoor tanks, and raised in outdoor ponds. DNA was extracted from each fish's digesta, anterior intestine, and posterior intestine, followed by amplification of the bacterial 16S and sequencing on the Illumina Miniseq platform. To attempt predicting the metabolic activities associated with the different gut bacterial populations, we used taxonomic information to estimate metabolic functions.

## MATERIALS & METHODS

### Sample collection

Adult *Chirostoma estor* were collected from Lake Patzcuaro (LP), Mexico, in the spring of 2018 (March) (19°36'14"N, 101°37'56"W, 22 °C, altitude 2,040 masl,  $N = 13$ ). In May of the same year, cultured adult fish of similar size to those from the lake were also harvested from fiberglass indoor tanks (tank culture = C) and outdoor earth ponds (extensive culture = E) ( $N = 20$  and  $N = 19$ , respectively) located in the aquaculture biotechnology laboratory at Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo in Morelia, Michoacan, Mexico (19°41'22"N, 101°14'56"W, 23 °C, altitude 1,896 masl). Populations of intensively cultured fish were established twenty years ago using stock from Lake Patzcuaro. Fish from the laboratory were released into the outdoor earth ponds 8 months before sampling, and are designated as E.

At harvest, individual fish from each environment were measured and weighed (Table S1). Immediately after collection, the abdominal cavities of fish were dissected under aseptic conditions, the intestines (guts) extracted and their contents (digesta = D) were gently squeezed out and placed into sterile tubes with 96% ethanol. The guts of *C. estor* consist of a short intestine with a single loop in the midgut (Fig. S1), and were divided into two sections (anterior = A, and posterior = P gut) and placed in sterile tubes containing 96% ethanol and stored at 4 °C until later DNA extraction. All specimens were treated following EU Directives 2010/63/EU for animal experimentation and 2007/526/EC accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes.

## DNA extraction and sequencing

Metagenomic DNA of fish intestines (D, A, and P) from the 3 different populations was extracted with a modified CTAB extraction protocol (*Doyle & Doyle, 1987*) by adding lysozyme (100 mg/mL), proteinase k (20 mg/mL), lithium chloride (5M), and sodium acetate (3 M, pH 5.2) to the extraction buffer. After DNA extraction, the V3 variable region of the 16S rRNA gene was PCR-amplified with the primer pair V3-338f and V3-533r (*Huse et al., 2008*). PCR products were paired-sequenced (300 cycles, 2X150) on an Illumina Miniseq, following Illumina standard protocol at Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Mazatlan, Sinaloa, Mexico.

## Bioinformatics

All amplicon sequence data derived from this work was submitted to NCBI Sequence Read Archive (SRA) ([SRX11596261](#) to [SRX11596334](#)) under BioProject accession ID: [PRJNA750495](#). After demultiplexing, CIAD sent back data as FastQ files which were preprocessed with PrinSeq (*Schmieder & Edwards, 2011*). Reads were then assembled and quality filtered with Flash v.1.2.7 software (*Magoc & Salzberg, 2011*), and VSEARCH (*Rognes et al., 2016*) was used for further processing, obtaining an abundance matrix of bacterial OTUs (operational taxonomic units clusterized at 97% identity) that was normalized using the metagenomeSeq method (*McMurdie & Holmes, 2014*). Taxonomic annotation was performed using VSEARCH (*Rognes et al., 2016*) against the SILVA138 database (*Quast et al., 2013*). The abundance matrix at the genus taxonomic level was used to calculate Good's coverage and alpha diversity indexes (*i.e.*, Chao 1 and Shannon indexes), which were estimated using the R Phyloseq library (*McMurdie & Holmes, 2013*). The genus-level abundance matrix was normalized using the metagenomeSeq method (*McMurdie & Holmes, 2014*), and the beta diversity distance matrix was calculated using Bray-Curtis dissimilarity. Beta diversity distance matrices were visualized with Non-metric Multidimensional Scaling plots (NMDS) of bacterial data grouped by environments and intestinal components, while ordination was based on between-sample dissimilarities calculated by Bray-Curtis distance and 999 permutations using library vegan 2.5-6 (*Oksanen et al., 2019*) in R software (*R Core Team, 2013*).

Although many groups define a core microbiome as those microbes with 100% occupancy across all samples (*Turnbaugh et al., 2007*), we considered (like other researchers) that a more relaxed threshold of greater than 80% occupancy would allow us to include more physiologically important bacteria in our analysis (*Baldo et al., 2015; do Vale-Pereira et al., 2017; Sweet & Bulling, 2017; Rimoldi et al., 2019*). Core microbiota was identified at the level of the genus when OTUs were present in at least 80% of samples per defined group (LP, C, E, D, A, and P) and at the level of OTU when present in at least one sample of each group (DLP, ALP, PLP, DC, AC, PC, DE, AE, PE). To compare microbiota between environments or digestive components, data was visualized with Venn diagrams (*Chen & Boutros, 2011*), in UpSet plots made with the package UpSetR (*Conway, Lex & Gehlenborg, 2017*).



## Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (*R Core Team, 2013*) and R library *vegan* 2.5-6 (*Oksanen et al., 2019*). Alpha diversity and relative abundance data were tested for normality and homoscedasticity by Shapiro–Wilk’s and Bartlett’s tests, respectively. Data sets grouped by intestinal component (Digesta, Anterior, and Posterior gut) or environment (Lake Patzcuaro, Intensive Culture, and Extensive Culture) were found to not be normally distributed. To compare beta diversity, environmental and intestinal component groups were statistically analyzed using non-metric dimensional scaling (NMDS) based on Bray-Curtis distances (*Bray & Curtis, 1957*), Analysis of Similarities (ANOSIM), as well as Adonis tests (Permutational Multivariate Analysis of Variance, PERMANOVA) using the Bray-Curtis index at 999 permutations. The number of reads across samples was normalized by sample size, and each taxon’s relative abundance (%) was calculated. Although results were generated for each taxonomic level, only Phylum and Genus levels are shown. Only taxa with the highest relative abundance were considered for statistical analysis, totaling 10 for phylum and 20 for genus. Phylum and genus abundance data were not normally distributed. Non-normal data were analyzed using nonparametric Kruskal–Wallis followed by Mann–Witney–Wilcoxon’s post hoc tests with statistical significance set at  $p < 0.05$ . Additional analysis to detect differential abundance was performed using the Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) method (*Segata et al., 2011*) integrated within the Galaxy framework (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>). In particular, the non-parametric Kruskal–Wallis sum-rank test was used to detect differentially abundant taxa, while Linear Discriminant Analysis (LDA) was used to estimate the effect size.

## Predictive functional analysis by PICRUST2

The functional metabolic profiles of 16S rDNA data were predicted using the Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2 (PICRUST2) v2.3.0 beta software that uses HMMER (<http://www.hmmmer.org>) to place OTUs into a reference phylogeny, followed by the *castor* R package to predict gene family abundances using hidden-state prediction. Pathway abundances are inferred based on the predicted sample functional profiles linked to pathway reactions using a modified version of MinPath (*Douglas et al., 2019*). Pathway abundance was then inferred using KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (*pathway\_pipeline.py*).

The output file (*path\_abun\_unstrat\_descrip.tsv*) of predicted pathway abundance was loaded to R software (*R Core Team, 2013*). The 60 most abundant functional pathways (taking into account the total average of the samples) were visualized using a heatmap created by the *ComplexHeatmap* package in R (*Gu, Eils & Schlesner, 2016*). To determine specific differences between each of the predicted paths, the output file of PICRUST2 (*path\_abun\_unstrat\_descrip.tsv*) was loaded into the MEGAN5 package (*Huson et al., 2016*) which allowed us to define the metabolic categories predicted in these bacteria. These metabolic predictions were then analyzed using STAMP (statistical analysis of taxonomic and functional profiles) (*Parks et al., 2014*) software to further interrogate all predicted functional datasets and produce graphical depictions of key functional pathways. To

contrast group metabolic predictions by environment (LP-C-E) and intestinal component (D-A-P) samples were compared using an ANOVA and Tukey-Kramer test. Pathways with a  $p$ -value  $< 0.05$  were considered to be statistically significant. For paired analysis of all nine metabolic predictions (DLP, ALP, PLP, DC, AC, PC, DE, AE, PE) simultaneously, environmental and intestinal components were compared using a two-sided Welch's  $t$ -test. Pathways with a  $p$ -value  $< 0.05$  were considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Bacterial diversity in the gut of *C. estor*

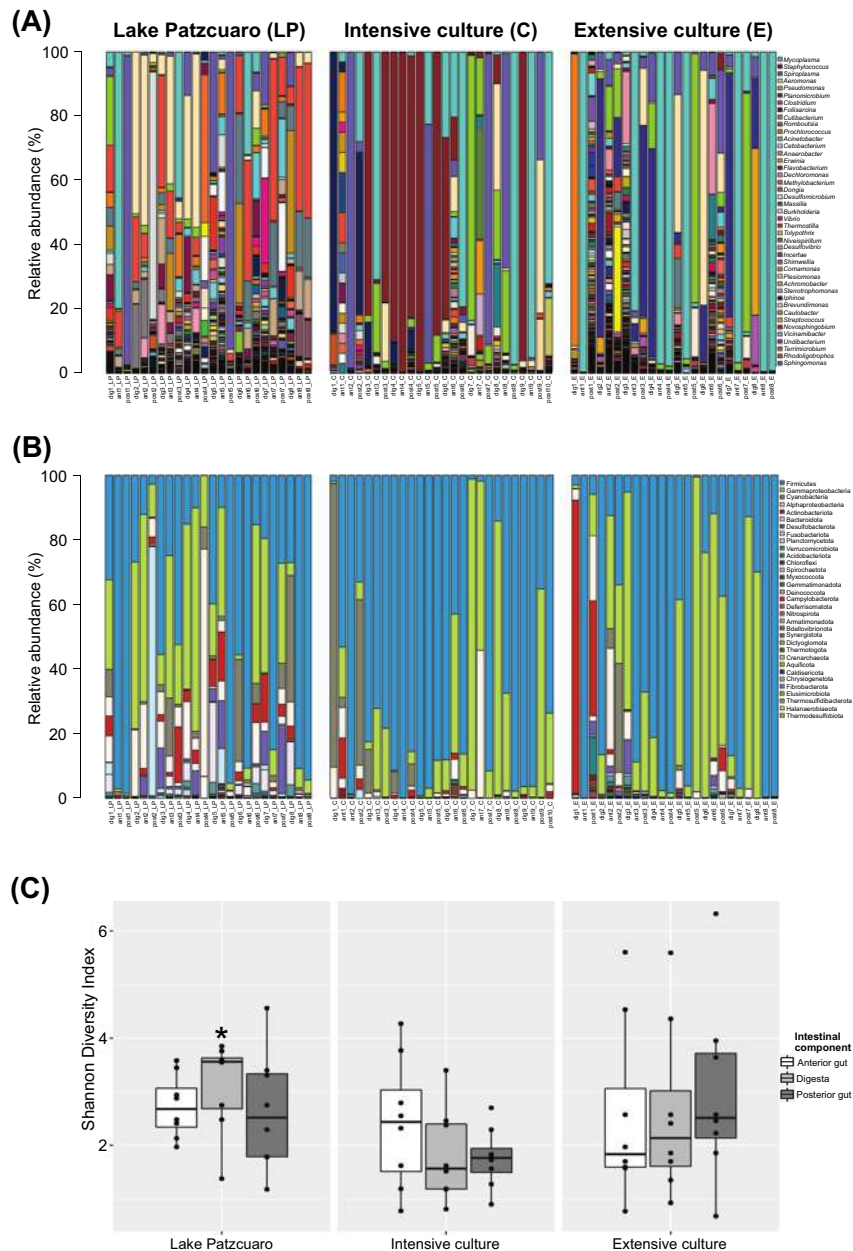
The bacterial community profile found in *C. estor* gut is highly variable from individual to individual, especially at the level of genus (Fig. 1A). At the level of phylum (Fig. 1B; Table S2) most samples contained Firmicutes (56.27%  $\pm$  4.28) and Proteobacteria (28.68%  $\pm$  3.47), of which the two most abundant classes were Gammaproteobacteria (24.35%  $\pm$  3.16) and Alphaproteobacteria (4.33%  $\pm$  1.25). Other common phyla were Cyanobacteria (4.69%  $\pm$  1.57), Actinobacteriota (3.51%  $\pm$  1.35), Bacteroidota (1.78%  $\pm$  0.37), Desulfobacterota (1.43%  $\pm$  0.44), Fusobacteriota (1.39%  $\pm$  1.05), Planctomycetota (0.97%  $\pm$  0.40), Verrucomicrobia (0.38%  $\pm$  0.10) and Acidobacteriota (0.29%  $\pm$  0.16).

Of the 1,207 annotated genera (Fig. 1A; Table 1), the most abundant bacterial genera observed within individual fish included *Mycoplasma* (19.95%  $\pm$  4.11), *Staphylococcus* (10.90%  $\pm$  3.30), *Spiroplasma* (10.23%  $\pm$  2.80), *Aeromonas* (7.51%  $\pm$  1.87), *Pseudomonas* (6.11%  $\pm$  1.86), *Planomicrobium* (4.75%  $\pm$  1.90), *Clostridium* (4.67%  $\pm$  1.32), *Foliisarcina* (2.37%  $\pm$  1.36) and *Cutibacterium* (2.16%  $\pm$  1.25). At the genus level, all digesta and Lake Patzcuaro samples contained significantly less *Mycoplasma* spp. than other intestinal components or environments (Table 1). Other differences were observed in the abundance of *Clostridium*, *Romboutsia*, *Prochlorococcus*, *Acinetobacter*, *Cetobacterium*, *Anaerobacter*, *Flavobacterium*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, and *Dongia* within lake samples, while *Staphylococcus* was most abundant in the intensive culture and *Planomicrobium*, *Erwinia*, and *Dechloromonas* were most abundant in the extensive culture (Table 1).

Alpha-diversity varied considerably but not significantly by both environment and intestinal compartment, except for the Shannon index of fish digesta from Lake Patzcuaro (LP) which was significantly higher than the Shannon index of digesta from cultivated fish ( $p = 0.021$ ) (Fig. 1C; Table S3). Bacterial diversity and Shannon index values from Lake Patzcuaro samples were significantly higher ( $p = 0.00477$ ) than those of fish from tank cultures or outdoor ponds (Table S3).

### Environmental influence on microbial communities

NMDS of the gut microbiota in fish from different environments (Fig. 2A) revealed a nearly separate cluster of the LP samples concerning the other two environments (C and E), the latter which largely overlapped instead. These observed differences were statistically supported by ANOSIM:  $R = 0.3119$ ,  $p = 0.001$  (Fig. 2A; Table S4), and PERMANOVA (Table S4). Repeating this analysis with data from the intestinal components showed complete overlapping of the three different groups (Fig. 2B), which surprisingly appeared to



**Figure 1** Gut microbiota diversity. (A) Normalized profiles of bacterial genera in fish guts. (B) Normalized profiles of bacterial phyla in fish guts. Legends display only the most abundant genera/phyla (with Proteobacteria classes). (C) Shannon diversity index of gut bacteria grouped by environments/intestinal components, calculated using OTU data. Asterisk indicates the significant ( $p < 0.05$ ) statistical difference between digesta from Lake Patzcuaro (DLP) and digesta from intensive culture (DC).

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.13052/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.13052/fig-1)

be significantly different from each other judging by ANOSIM (R-value of 0.06763,  $p = 0.004$  (Fig. 2B; Table S5)). PERMANOVA supported this result, showing a significant difference between digesta and anterior gut with an F value of 2.2341,  $p = 0.001$  (Table S5). ANOSIM and PERMANOVA analyses were stratified by intestinal component or environment,

**Table 1** Total mean relative abundance (%) (first column)  $\pm$  SE, and mean relative abundance  $\pm$  SE of the 20 most prevalent genera found in guts from different environments. Data of digesta, D; anterior intestine, A; and posterior intestine, P of pike silverside in the three environments (Lake Patzcuaro, LP; Intensive Culture, C; Extensive Culture, E). Statistical comparisons were performed separately by intestinal components (D, A, P) and environments (LP, C, E). Different letters indicate statistical significance between taxonomic group abundance in a row ( $p < 0.05$ ).

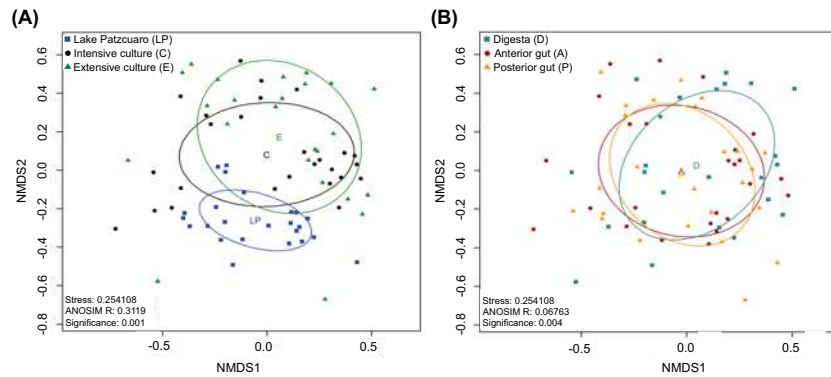
Genus	Total abundance (N = 74)	Intestinal component			Environment		
		D (N = 24)	A (N = 25)	P (N = 25)	LP (N = 24)	C (N = 26)	E (N = 24)
<i>Mycoplasma</i>	19.95 $\pm$ 4.11	1.55 $\pm$ 1.11 <b>B</b>	35.88 $\pm$ 8.59 <b>A</b>	21.68 $\pm$ 7.25 <b>A</b>	7.17 $\pm$ 3.87 <b>b</b>	19.94 $\pm$ 6.45 <b>ab</b>	32.76 $\pm$ 9.31 <b>a</b>
<i>Staphylococcus</i>	10.9 $\pm$ 3.30	18.08 $\pm$ 7.28	4.64 $\pm$ 3.98	10.28 $\pm$ 5.44	0.09 $\pm$ 0.03 <b>b</b>	30.71 $\pm$ 8.14 <b>a</b>	0.25 $\pm$ 0.21 <b>b</b>
<i>Spiroplasma</i>	10.23 $\pm$ 2.80	5.49 $\pm$ 1.79	10.67 $\pm$ 5.31	14.35 $\pm$ 6.15	11.68 $\pm$ 5.47	14.48 $\pm$ 6.01	4.18 $\pm$ 1.29
<i>Aeromonas</i>	7.51 $\pm$ 1.87	10.62 $\pm$ 4.18	6.96 $\pm$ 3.23	5.08 $\pm$ 2.09	11.59 $\pm$ 3.88	4.72 $\pm$ 2.25	6.44 $\pm$ 3.48
<i>Pseudomonas</i>	6.11 $\pm$ 1.86	6.31 $\pm$ 3.55	3.93 $\pm$ 1.46	8.10 $\pm$ 4.14	1.86 $\pm$ 0.89	7.56 $\pm$ 3.36	8.79 $\pm$ 4.32
<i>Planomicrobium</i>	4.75 $\pm$ 1.90	11.03 $\pm$ 5.09	0.25 $\pm$ 0.21	3.23 $\pm$ 2.44	0.02 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	0.05 $\pm$ 0.04 <b>b</b>	14.57 $\pm$ 5.39 <b>a</b>
<i>Clostridium</i>	4.67 $\pm$ 1.32	4.18 $\pm$ 1.79	6.88 $\pm$ 2.94	2.92 $\pm$ 1.95	13.77 $\pm$ 3.42 <b>a</b>	0.08 $\pm$ 0.06 <b>c</b>	0.53 $\pm$ 0.28 <b>b</b>
<i>Foliisarcina</i>	2.37 $\pm$ 1.36	4.55 $\pm$ 3.63	0.21 $\pm$ 0.13	2.44 $\pm$ 2.01	0.22 $\pm$ 0.10 <b>b</b>	6.53 $\pm$ 3.77 <b>ab</b>	0.02 $\pm$ 0.01 <b>c</b>
<i>Cutibacterium</i>	2.16 $\pm$ 1.25	4.49 $\pm$ 3.77	1.23 $\pm$ 0.70	0.87 $\pm$ 0.53	2.21 $\pm$ 0.77 <b>b</b>	0.63 $\pm$ 0.49 <b>c</b>	3.78 $\pm$ 3.78 <b>a</b>
<i>Romboutsia</i>	2.06 $\pm$ 0.62	2.68 $\pm$ 1.31	2.32 $\pm$ 1.11	1.21 $\pm$ 0.77	5.41 $\pm$ 1.60 <b>a</b>	0.03 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	0.92 $\pm$ 0.67 <b>b</b>
<i>Prochlorococcus</i>	1.43 $\pm$ 0.70	3.34 $\pm$ 2.00	0.95 $\pm$ 0.71	0.08 $\pm$ 0.03	4.25 $\pm$ 2.07 <b>a</b>	0.01 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	0.14 $\pm$ 0.08 <b>b</b>
<i>Acinetobacter</i>	1.37 $\pm$ 0.34	0.59 $\pm$ 0.14	1.41 $\pm$ 0.43	2.09 $\pm$ 0.89	2.66 $\pm$ 0.92 <b>a</b>	0.68 $\pm$ 0.27 <b>b</b>	0.83 $\pm$ 0.33 <b>b</b>
<i>Cetobacterium</i>	1.37 $\pm$ 1.05	0.32 $\pm$ 0.16	0.43 $\pm$ 0.40	3.32 $\pm$ 3.07	4.05 $\pm$ 3.20 <b>a</b>	0.11 $\pm$ 0.10 <b>b</b>	0.04 $\pm$ 0.03 <b>b</b>
<i>Anaerobacter</i>	1.17 $\pm$ 0.35	1.07 $\pm$ 0.62	1.67 $\pm$ 0.69	0.77 $\pm$ 0.50	3.49 $\pm$ 0.92 <b>a</b>	0.01 $\pm$ 0.01 <b>c</b>	0.11 $\pm$ 0.05 <b>b</b>
<i>Erwinia</i>	0.98 $\pm$ 0.70	2.50 $\pm$ 2.16	0.18 $\pm$ 0.13	0.33 $\pm$ 0.20	0.02 $\pm$ 0.01 <b>c</b>	0.14 $\pm$ 0.12 <b>bc</b>	2.86 $\pm$ 2.15 <b>a</b>
<i>Flavobacterium</i>	0.91 $\pm$ 0.31	1.50 $\pm$ 0.82	0.53 $\pm$ 0.17	0.73 $\pm$ 0.45	2.53 $\pm$ 0.87 <b>a</b>	0.07 $\pm$ 0.05 <b>c</b>	0.20 $\pm$ 0.08 <b>b</b>
<i>Dechloromonas</i>	0.89 $\pm$ 0.49	1.14 $\pm$ 0.94	1.48 $\pm$ 1.15	0.05 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	0.01 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	2.72 $\pm$ 1.47 <b>a</b>
<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	0.73 $\pm$ 0.62	0.02 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.05	2.02 $\pm$ 1.83	2.08 $\pm$ 1.91 <b>a</b>	0.09 $\pm$ 0.07 <b>b</b>	0.08 $\pm$ 0.05 <b>b</b>
<i>Dongia</i>	0.71 $\pm$ 0.37	1.04 $\pm$ 0.84	0.98 $\pm$ 0.72	0.12 $\pm$ 0.06	2.17 $\pm$ 1.08 <b>a</b>	0.01 $\pm$ 0.00 <b>b</b>	0.01 $\pm$ 0.01 <b>b</b>
<i>Desulfomicrobium</i>	0.66 $\pm$ 0.35	0.58 $\pm$ 0.41	0.53 $\pm$ 0.50	0.88 $\pm$ 0.85	1.99 $\pm$ 1.06 <b>a</b>	0.00 $\pm$ 0.00 <b>b</b>	0.06 $\pm$ 0.03 <b>a</b>

showing differences in digesta taken from fish harvested from the three environments (DLP, DC, and DE), differences in anterior guts from fish harvested in ALP vs AC and AE, while in the posterior gut, there was a significant difference only between PLP vs PE (Table S5).

### Core microbiota analysis

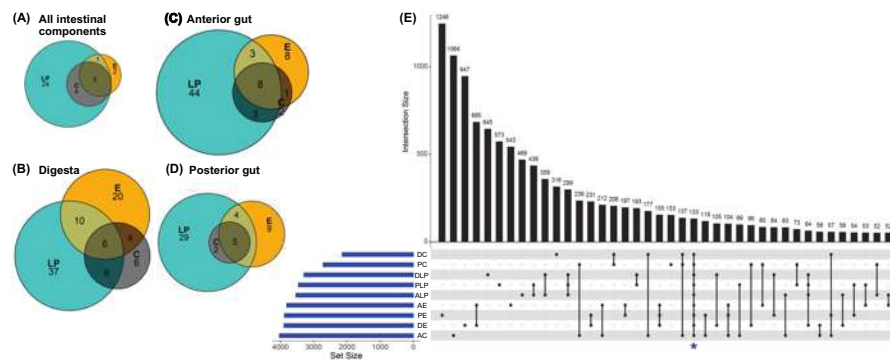
Analysis to determine the core microbiota suggested that the genera *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, and *Acinetobacter* were present in all intestinal components of fish harvested from in all three environments (Fig. 3A). In addition to the aforementioned core genera, digesta samples from all three environments also contained *Vibrio* and *Bacillus* (Fig. 3B); all anterior intestine samples contained *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Spiroplasma*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, and *Weissella* genera (Fig. 3C), while posterior intestine samples contained *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* genera (Fig. 3D).

An UpSet plot was made to show OTUs (summed across replicates in 9 different groups) shared between the different environments and intestinal components (Fig. 3E). There was



**Figure 2 Beta diversity analysis.** Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot of the Bray–Curtis beta-diversity from *C. estor* microbiota profiles, estimated from the OTU abundance matrix. The two groupings were by environment (A) and by intestinal component (B).

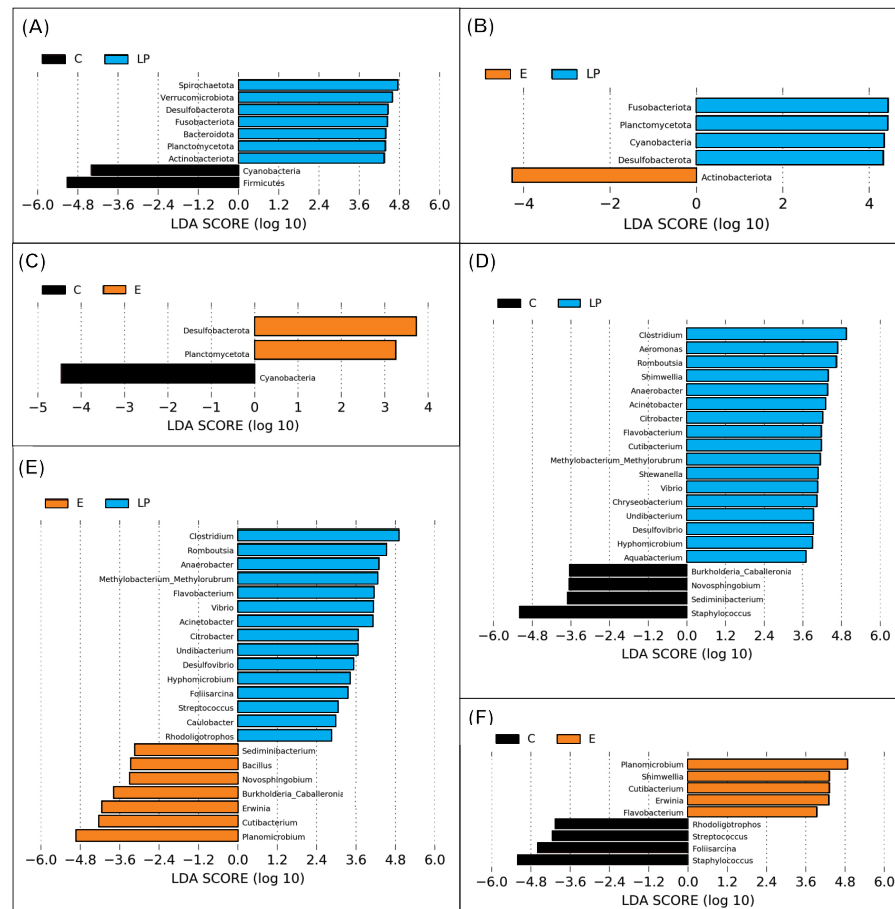
Full-size DOI: 10.7717/peerj.13052/fig-2



**Figure 3 Core microbiota amongst different environmental groups.** (A) Core microbiota were defined at the level of genera as present in at least 80% of the samples of a group. All three environments (LP, Lake Patzcuaro; C, Intensive Culture; E, Extensive Culture) shared five genera regardless of the intestinal compartment (5/36 genera). (B) In samples of digesta, there were six core bacterial genera (6/89 genera). (C) In samples of the fish anterior intestine, there were eight genera shared between environments (8/69 genera). (D) In samples of the fish posterior intestine, there were five genera shared between environments (5/49 genera). (E) An UpSet plot based on the presence/absence of OTUs after summing up across replicates. Presence means OTUs occurred in at least one sample of each group (DC, digesta of intensive culture; PC, posterior intestine of intensive culture; DLP, digesta of Lake Patzcuaro; PLP, posterior intestine of Lake Patzcuaro; ALP, anterior intestine of Lake Patzcuaro; AE, anterior intestine of extensive culture; PE, posterior intestine of extensive culture; DE, digesta of extensive culture; AC, anterior intestine of intensive culture). The set size of each group is plotted in horizontal bars (in blue). Bars show the number of OTUs present uniquely in a specified group and dark circles while connecting bars indicate shared OTUs between multiple samples.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.13052/fig-3

a total of 133 OTUs (Fig. 3E), of which only 42 were annotated to the level of genus using the SILVA database (Table S6). The two other UpSet plots show the core microbiota consisting of 4 different genera (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, and *Spiroplasma*), as well as one OTU which was present in more than 80% of all the samples (Fig. S2).



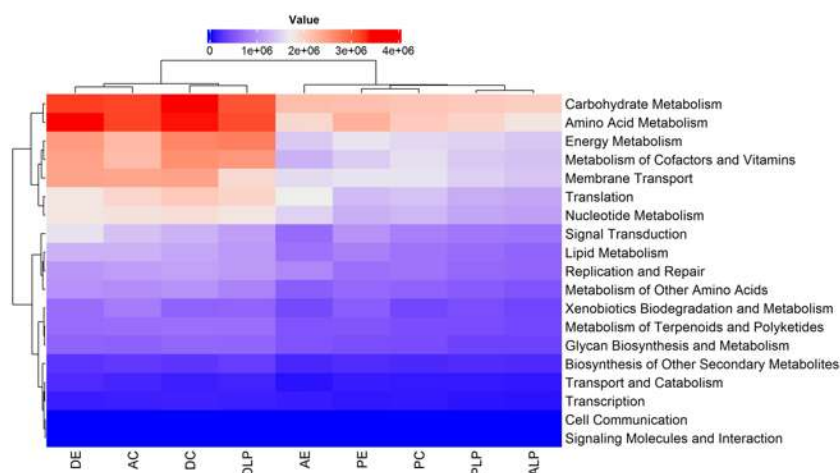
**Figure 4** Genera prevalence deduced by LefSe analysis. Significant differences in the relative abundance of microbial phyla and genera by environment group (Lake Patzcuaro, LP; Intensive culture, C; Extensive culture, E). (A–C) Differences in phylum abundance between LP & C, LP & E, and C & E. (D–F) Differences in genus abundance between LP & C, LP & E, and C & E. Statistical significance of LDA effect size was evaluated in the Kruskal-Wallis test with  $p$ -value cutoff = 0.05.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.13052/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.13052/fig-4)

## Differential abundance of taxonomic groups

A total of 11 phyla and 48 genera were present in different samples, with significant taxonomic variation when comparing LP vs C, LP vs E, and C vs E (Fig. 4).

LefSe analysis showed that fish present in the LP environment had a greater diversity of phyla than fish grown in C (7 vs 2) or E (4 vs 1) and that in general, fish grown in the E environment had a greater diversity of phyla than fish grown in the C environment (2 vs 1) (Figs. 4A, 4B and 4C). Zooming into the level of genus, there were 17 and 15 genera that were more highly abundant in LP than in C (4) or E (7) groups, respectively (Figs. 4D and 4E). The comparison between C or E fish microbiota suggests that only 4 or 5 genera were abundant in each (Fig. 4F).



**Figure 5** Heatmap and dendrogram of KOs pathways in nine different groups. Prediction by PICRUSt2 is shown at KEGG's first level. AE, anterior intestine/extensive culture; ALP, anterior intestine/Lake Patzcuaro; PLP, posterior intestine/Lake Patzcuaro; PC, posterior intestine/intensive culture; PE, posterior intestine/extensive culture; DLP, digesta/Lake Patzcuaro; DC, digesta/intensive culture; AC, anterior intestine/intensive culture; DE, digesta/extensive culture.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.13052/fig-5](https://doi.org/10.7717/peerj.13052/fig-5)

### Functional metabolic prediction using PICRUSt2

A total of 440 functional pathways were predicted for the 74 different samples (from all components and environments) that were analyzed. Of these, the 60 most abundant and with statistical differences between samples were re-analyzed, with metabolic predictions shown in Fig. S3. It was predicted that certain metabolic pathways would be over-represented in digesta samples relative to others (DLP, D, and DE). The majority of the functional KO pathways predicted to occur in all 9 groups belonged to four main categories: (i) Metabolism, (ii) Genetic Information Processing, (iii) Environmental Information Processing, and (iv) Cellular Processes (Fig. 5).

Within these predicted metabolic pathways, genes associated with the metabolism of energy, cofactors, vitamins, nucleotides, carbohydrates, and amino acids were over-represented in cultured anterior intestines and digesta samples harvested from all environments (DLP, DC, AC, and DE) (Fig. 5). Predicted differences in metabolic pathways and their regulation are shown in Figs. S3 and S4.

## DISCUSSION

Gut microbiota has the potential to influence the health and welfare of fish raised in commercial aquaculture, making it important to understand what factors may influence microbiome diversity. Hypothesizing that captive conditions would alter the gut microbiome of the Mexican pike silverside, we compared the microbiota in wild fish to those raised in captivity. We characterized the microbiota found in the digesta and intestines of *C. estor* collected from different environments using high-throughput DNA sequencing.

The most abundant bacterial phyla in *C. estor* guts harvested from all three environments were Proteobacteria and Firmicutes, which are both common and abundant in most fish species (Egerton et al., 2018). Despite numerous published studies on fish microbiomes, few publications report their results at the genus level as we have here in the current study. In agreement with other freshwater teleosts, the following genera were abundant in many of our samples: *Propionibacterium* (or *Cutibacterium*), *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Cetobacterium*, *Pseudomonas*, *Romboutsia*, *Spiroplasma*, *Vibrio*, *Aeromonas*, and *Mycoplasma* (e.g., Roeselers et al., 2011; Gajardo et al., 2016; do Vale-Pereira et al., 2017; Rimoldi et al., 2019; Ruzauskas et al., 2021). Although it is hard to predict physiological roles for these microbes, some bacteria of the genera *Staphylococcus*, *Vibrio*, and *Aeromonas* can be opportunistic pathogens, while others have been used as probiotics in fish diets promoting positive immune and growth responses (Austin et al., 1995; Taoka et al., 2006; Pieters et al., 2008; Abd El-Rhman, Khattab & Shalaby, 2009; Korkea-aho et al., 2012; Gao et al., 2016; Qi et al., 2020; Tran et al., 2020). *Undibacterium* spp. was abundant in wild *C. estor*, and has also been isolated from zebrafish (*Danio rerio*) and Korean shiner (*Coreoleuciscus splendidus*) (Kämpfer et al., 2016; Lee et al., 2019). Wild *C. estor* contained abundant *Anaerobacter*, *Methylobacterium*-*Methylorubrum*, and *Hyphomicrobium*, and while their influence on fish physiology is unknown, they are also known to be abundant in other aquatic organisms such as coral (Maire et al., 2021).

Interestingly, our results suggest that the microbiota of *C. estor* is very similar to that of other freshwater omnivorous fish (Sullam et al., 2012), containing both high levels of Actinobacteria while lacking Bacteroidetes. *C. estor* also contained a high relative abundance of Firmicutes and Cyanobacteria, a low relative abundance of Proteobacteria, and an absence of Enterobacteriales which are strongly characteristic of herbivorous marine fish (Sullam et al., 2012). These particularities of the *C. estor* microbiome might be diagnostic for a fish with a specialized zooplanktonic and planktonic diet and may be linked to its specialized form of agastric digestion.

*C. estor* gut samples had high inter-individual variability (Figs. 1A and 1B), which could reflect the stochastic instability of microbial diversity in the rapidly changing environment of the short *C. estor* intestine. Despite this high variability, we were able to predict the existence of a core microbiome in *C. estor* (Figs. 3A–3D and Fig. S2 above). Core microbiota included 4 genera and 133 OTUs, which is a number similar to the core microbiota for other fish species (Dehler, Secombes & Martin, 2017; Rimoldi et al., 2019).

Most significantly, the diverse bacterial genera observed exclusively in Lake grown fish samples (24 genera and 166 OTUs), suggests that fish grown in captivity lose some of their microbial diversity. Future experiments will be required to study the impact that this loss of bacterial diversity might have on fish digestion, health, and growth. Similar to other published experiments and aiming to find bacteria with probiotic potential, such experiments might include transplanting of microbial consortia or cross inoculation with individual strains isolated from the intestines of wild fish, farmed fish, or autochthonous aquatic microbial communities (Robertson et al., 2000; Wang & Xu, 2006; Abd El-Rhman, Khattab & Shalaby, 2009; Essa et al., 2010; Korkea-aho et al., 2012; Dias et al., 2018; Li et al., 2019; Mohammadian et al., 2019; Mukherjee, Chandra & Ghosh, 2019; Xia et al., 2020).



Identification of a core microbiota and the results of the differential abundance analysis (LEfSe) showed that samples from Lake Patzcuaro had higher prevalent and abundant genera compared to fish samples from Intensive and Extensive Cultures. This could be explained by the zooplanktonic feeding habits of the species ([Martínez-Palacios et al., 2007](#)) and the greater variety of food items found in the wild. Our results are in line with the previously published theory that a wild environment is a greater source of bacterial diversity than a controlled environment ([Dehler, Secombes & Martin, 2017](#)).

Bacterial diversity seemed to be higher in the anterior vs the posterior intestine (8 vs. 5 core genera), which could be related to differences in digestive physiology (pH) along the digestive canal as has been reported previously ([Martínez-Palacios et al., 2002](#)). Nevertheless, individual gut components didn't develop significantly distinct microbial communities ([Fig. 2B](#)), explained perhaps by the constant turnover of intestinal contents in fish that feed very frequently.

Prediction of differential microbiome metabolic potential using PICRUSt2 suggested that genes associated with amino acid, vitamins and cofactors, and energy metabolic pathways would be over-represented in certain compartments of the digestive system in *C. estor*, implying (as also observed by others for other fish species) a link between microbial diversity and fish physiological function ([Geraylou et al., 2012](#); [Li et al., 2017](#); [Agus, Planchais & Sokol, 2018](#)). It is important to remember that results from PICRUSt2 are only bioinformatic predictions based on the taxonomy of 16S rRNA genes and should be interpreted with caution. It will be important to follow up our experiment with more in-depth functional studies such as metatranscriptomics, metabolomics, and microbiome transplantation to validate predictions about microbiota functionality in this fish species.

## CONCLUSIONS

This is the first study on the Mexican pike silverside *Chirostoma estor* (a short-gut agastric model) to employ high-throughput sequencing of 16S rRNA genes to define the diversity of intestinal bacteria while attempting to predict their function. Microbial diversity was lowest in fish cultured in fiberglass tanks, intermediate in fish cultured in earth ponds, and highest in wild fish. These results suggest that husbandry can influence Mexican pike silverside microbiota, with possible implications for its commercial aquaculture. Restoration or optimization of lost intestinal microbiota, perhaps through autochthonous probiotic diet supplementation, may become a technology to promote better growth and health of captive fish in the future.

Microbial profiles showed high inter-individual variation that could be due to the dynamic nature of this fish's digestive tract. Finally, a core microbiota was identified in *C. estor*, although few of the genera identified were similar to those of other fish species. Compared to other fish species, this agastric short-intestine fish also possesses a unique digestive microbiota. The development of culturing methods of similar agastric fish with aquaculture potential such as anchovies, sardines, other atherinopsids, and hemyranchids may benefit from this intestinal microbiome data on the model agastric fish *Chirostoma estor*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank MSc Sibila Concha Santos and Jesús López García for their invaluable technical assistance in the LANMDA laboratory and the sampling field.

## ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

### Funding

This study was supported by Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (projects No. 315841 and 315209), Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH, and CONACYT doctoral scholarship 701910. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (projects No. 315841 and 315209).  
Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH.  
CONACYT doctoral scholarship 701910.

### Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

### Author Contributions

- Jesús Mateo Amillano-Cisneros performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Perla T. Hernández-Rosas performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, and approved the final draft.
- Bruno Gomez-Gil and Pamela Navarrete-Ramírez conceived and designed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- María Gisela Ríos-Durán and David Johnston-Monje analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Carlos Cristian Martínez-Chávez conceived and designed the experiments, performed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Carlos Antonio Martínez-Palacios conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Luciana Raggi conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

### Animal Ethics

The following information was supplied relating to ethical approvals (i.e., approving body and any reference numbers):

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT), Mexico, provided full approval for this research (2018-294826).

### DNA Deposition

The following information was supplied regarding the deposition of DNA sequences:

The sequence data are available at the NCBI BioProject: [PRJNA750495](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA750495).

### Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

Raw sequence data are available at the NCBI Sequence Read Archive (SRA) ([SRX11596261](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX11596261) to [SRX11596334](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX11596334)).

### Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.13052#supplemental-information>.

## REFERENCES

- Abd El-Rhman AM, Khattab YAE, Shalaby AME. 2009.** *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* **27**:175–180 DOI [10.1016/j.fsi.2009.03.020](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.020).
- Agus A, Planchais J, Sokol H. 2018.** Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host & Microbe* **23**:716–724 DOI [10.1016/j.chom.2018.05.003](https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003).
- Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, Effendi I, Griffith DRW. 1995.** A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* **18**:93–96 DOI [10.1111/j.1365-2761.1995.tb01271.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb01271.x).
- Baldo L, Riera JL, Tooming-Klunderud A, Albà MM, Salzburger W. 2015.** Gut microbiota dynamics during dietary shift in eastern african cichlid fishes. *PLOS ONE* **10**(5):1–23 DOI [10.1371/journal.pone.0127462](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127462).
- Bray JR, Curtis JT. 1957.** An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**(4):325–349 DOI [10.2307/1942268](https://doi.org/10.2307/1942268).
- Butt RL, Volkoff H. 2019.** Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology* **10**(9):1–12 DOI [10.3389/fendo.2019.00009](https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009).
- Chen H, Boutros PC. 2011.** VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* **12**:1–7 DOI [10.1186/1471-2105-12-35](https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-35).
- Conway JR, Lex A, Gehlenborg N. 2017.** UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* **33**(18):2938–2940 DOI [10.1093/bioinformatics/btx364](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx364).

- Dehler CE, Secombes CJ, Martin SAM. 2017. Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 467:149–157 DOI 10.1016/j.aquaculture.2016.07.017.
- Dias JAR, Abe HA, Sousa NC, Couto MVS, Cordeiro CAM, Meneses JO, Cunha FS, Mourião JLP, Martins ML, Barbas LAL, Carneiro PCF, Maria AN, Fujimoto RY. 2018. Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture Research* 49:3063–3070 DOI 10.1111/are.13767.
- do Vale-Pereira G, da Cunha DG, Pedreira-Mourino JL, Rodiles A, Jaramillo-Torres A, Merrifiedls DL. 2017. Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and isolation of potential probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 123:1298–1311 DOI 10.1111/jam.13572.
- Douglas AE. 2019. Simple animal models for microbiome research. *Nature Reviews Microbiology* 17:764–775 DOI 10.1038/s41579-019-0242-1.
- Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld J, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI. 2019. PICRUSt2: an improved and extensible approach for metagenome inference. *BioRxiv*. 672295 DOI 10.1101/672295.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19(1):11–15.
- Egerton S, Culloty S, Whooley J, Stanton C, Ross RP. 2018. The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology* 9:1–17 DOI 10.3389/fmicb.2018.00873.
- Essa MA, El-Serafy SS, El-Ezabi MM, Daboor SM, Esmael NA, Lall SP. 2010. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the Arabian Aquaculture Society* 5(2):143–162.
- Fonseca-Madrigal J, Navarro JC, Hontoria F, Tocher DR, Martínez-Palacios CA, Monroig O. 2014. Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of  $\Delta 4$  and  $\Delta 6\Delta 5$  desaturases of *Chirostoma estor*. *Journal of Lipid Research* 55:1408–1419 DOI 10.1194/jlr.M049791.
- Gajardo K, Rodiles A, Kortner TM, Krogdahl Å, Bakke AM, Merrifield DL, Sørum H. 2016. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a basis for comparative gut microbial research. *Scientific Reports* 6:1–10 DOI 10.1038/srep30893.
- Gao Q, Xiao C, Min M, Zhang C, Peng S, Shi Z. 2016. Effects of probiotics dietary supplementation on growth performance, innate immunity and digestive enzymes of silver pomfret, *Pampus argenteus*. *Indian Journal of Animal Research* 50(6):936–941 DOI 10.18805/ijar.9640.
- Geraylou Z, Souffreau C, Rurangwa E, D'Hondt S, Callewaert L, Courtin CM, Delcour JA, Buyse J, Ollevier F. 2012. Effects of arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) performance, immune responses and gastrointestinal microbial community. *Fish & Shellfish Immunology* 33:718–724 DOI 10.1016/j.fsi.2012.06.010.

- Gu Z, Eils R, Schlesner M. 2016.** Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **32(18)**:2847–2849 DOI [10.1093/bioinformatics/btw313](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313).
- Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Welch DM, Relman DA, Sogin ML. 2008.** Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLOS Genetics* **4(11)**:1–10 DOI [10.1371/journal.pgen.1000255](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255).
- Huson DH, Beier S, Flade I, Górska A, El-Hadidi M, Mitra S, Ruscheweyh H-J, Tappu R. 2016.** MEGAN community edition—interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. *PLOS Computational Biology* **12(6)**:1–12 DOI [10.1371/journal.pcbi.1004957](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957).
- Kämpfer P, Irgang R, Busse H-J, Poblete-Morales M, Kleinhagauer T. 2016.** *Undibacterium danionis* sp. nov. isolated from a zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**:3625–3631 DOI [10.1099/ijsem.0.001244](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001244).
- Korkea-aho TL, Papadopoulou A, Heikkinen J, Von Wright A, Adams A, Austin B. 2012.** *Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity. *Journal of Applied Microbiology* **113**:24–35 DOI [10.1111/j.1365-2672.2012.05325.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05325.x).
- Lee S-Y, Kang W, Kim PS, Kim HS, Sung H, Shin N-R, Whon TW, Yun JH, Lee J-Y, Lee J-Y, Jung M-J, Jeong Y-S, Tak EJ, Han JE, Hyun D-W, Kang M-S, Lee B-H, Lee B-H, Bae J-W. 2019.** *Undibacterium piscinae* sp. nov. isolated from Korean shiner intestine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **69**:3148–3154 DOI [10.1099/ijsem.0.003604](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003604).
- Lescak EA, Milligan-Myhre KC. 2017.** Teleosts as model organisms to understand host-microbe interactions. *Journal of Bacteriology* **199(15)**:e00868-16 DOI [10.1128/JB.00868-16](https://doi.org/10.1128/JB.00868-16).
- Li J, Wu ZB, Zhang Z, Zha JW, Qu SY, Qi XY, Wang G-X. 2019.** Effects of potential probiotic *Bacillus velezensis* K2 on growth, immunity and resistance to *Vibrio harveyi* infection of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀). *Fish and Shellfish Immunology* **93**:1047–1055 DOI [10.1016/j.fsi.2019.08.047](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.047).
- Li T, Long M, Li H, Gatesoupe FJ, Zhang X, Zhang Q, Feng D, Li A. 2017.** Multi-omics analysis reveals a correlation between the host phylogeny, gut microbiota and metabolite profiles in cyprinid fishes. *Frontiers in Microbiology* **8**:1–11 DOI [10.3389/fmicb.2017.00454](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00454).
- Magoc T, Salzberg SL. 2011.** FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27(21)**:2957–2963 DOI [10.1093/bioinformatics/btr507](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507).
- Maire J, Girvan SK, Barkla SE, Perez-Gonzalez A, Suggett DJ, Blackall LL, Van Oppen MJH. 2021.** Intracellular bacteria are common and taxonomically diverse in cultured and *in hospite* algal endosymbionts of coral reefs. *The ISME Journal* **15**:2028–2042 DOI [10.1038/s41396-021-00902-4](https://doi.org/10.1038/s41396-021-00902-4).
- Manjakasy JM, Day RD, Kemp A, Tibbetts IR. 2009.** Functional morphology of digestion in the stomachless, piscivorous needlefishes *Tylosurus gaviatoides*

- and *Strongylura leiura ferox* (Teleostei: Beloniformes). *Journal of Morphology* **270**(10):1155–1165 DOI [10.1002/jmor.10745](https://doi.org/10.1002/jmor.10745).
- Martínez-Palacios CA, Aguilar-Valdez MC, Strüssmann CA, Ríos-Durán MG, Toledo-Cuevas EM, Navarrete-Ramírez P, Fonseca-Madrigal J, Martínez-Chávez CC, Ross LG. 2019.** The orobranchial structures in four neotropical silversides (Teleostei: Atherinopsidae) related with feeding habits. *Zoomorphology* **138**(1):511–523 DOI [10.1007/s00435-019-00457-1](https://doi.org/10.1007/s00435-019-00457-1).
- Martínez-Palacios CA, Concha-Santos S, Toledo-Cuevas EM, Ríos-Durán MG, Martínez-Chávez CC, Navarrete-Ramírez P, Raggi L, Strussmann C, Hualde JP, Demicheli MA, Fonseca-Madrigal J. 2020.** High levels of docosahexaenoic acid are present in eight New World silversides (Pisces: Atherinopsidae). *Neotropical Ichthyology* **18**:1–11 DOI [10.1590/1982-0224-2019-0089](https://doi.org/10.1590/1982-0224-2019-0089).
- Martínez-Palacios CA, Ríos-Durán MG, Ambriz-Cervantes L, Jauncey KJ, Ross LG. 2007.** Dietary protein requirement of juvenile Mexican Silverside (*Menidia estor* Jordan 1879), a stomachless zooplanktophagous fish. *Aquaculture Nutrition* **13**:304–310 DOI [10.1111/j.1365-2095.2007.00479.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00479.x).
- Martínez-Palacios CA, Ríos-Durán MG, Campos-Mendoza A, Toledo-Cuevas M, Ross LG. 2002.** Avances en el Cultivo del Pescado Blanco de Patzcuaro *Chirostoma estor estor*. In: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Gaxiola-Cortés MG, Simoes N, eds. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002*. Cancún, Quintana Roo, México Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., Mexico, 336–351.
- McMurdie PJ, Holmes S. 2013.** phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE* **8**:e61217 DOI [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217).
- McMurdie PJ, Holmes S. 2014.** Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLOS Computational Biology* **10**(4):1–12 DOI [10.1371/journal.pcbi.1003531](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531).
- Mohammadian T, Nasirpour M, Tabandeh MR, Heidary AA, Ghanei-Motlagh R, Hosseini SS. 2019.** Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection. *Fish and Shellfish Immunology* **86**:269–279 DOI [10.1016/j.fsi.2018.11.052](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.052).
- Mukherjee A, Chandra G, Ghosh K. 2019.** Probiotics: effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture* **512**:1–15 DOI [10.1016/j.aquaculture.2019.734302](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734302).
- Navarrete P, Magne F, Araneda C, Fuentes P, Barros L, Opazo R, Espejo R, Romero J. 2012.** PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLOS ONE* **7**(2):1–10 DOI [10.1371/journal.pone.0031335](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031335).
- Nayak SK. 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* **41**:1553–1573 DOI [10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x).

- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2019. Package 'vegan' Version 2.5-6. Available at <https://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan> (accessed on 06 July 2021).
- Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30(21):3123–3124 DOI 10.1093/bioinformatics/btu494.
- Perry WB, Lindsay E, Payne CJ, Brodie C, Kazlauskaitė R. 2020. The role of the gut microbiome in sustainable teleost aquaculture. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287:1–10 DOI 10.1098/rspb.2020.0184.
- Pieters N, Brunt J, Austin B, Lyndon AR. 2008. Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 105:723–732 DOI 10.1111/j.1365-2672.2008.03817.x.
- Qi X, Xue M, Cui H, Yang K, Song K, Zha J, Wang G, Ling F. 2020. Antimicrobial activity of *Pseudomonas monteilii* JK-1 isolated from fish gut and its major metabolite, 1-hydroxyphenazine, against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 526:1–8 DOI 10.1016/j.aquaculture.2020.735366.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FOoliver. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41:590–596 DOI 10.1093/nar/gks1219.
- R Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at <http://www.R-project.org/> (accessed on 10 June 2021).
- Rimoldi S, Gini E, Iannini F, Gasco L, Terova G. 2019. The effects of dietary insect meal from *Hermetia illucens* prepupae on autochthonous gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals* 9:1–17 DOI 10.3390/ani9040143.
- Robertson P, O'dowd C, Burrells C, Williams P, Austin B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185:235–243 DOI 10.1016/S0044-8486(99)00349-X.
- Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, Rawls JF. 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME Journal* 5:1595–1608 DOI 10.1038/ismej.2011.38.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:1–22 DOI 10.7717/peerj.2584.
- Ross LG, Martínez-Palacios CA, Aguilar-Valdez MC, Beveridge MCM, Chávez-Sánchez MC. 2006. Determination of feeding mode in fishes: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. *Journal of Fish Biology* 68:1782–1794 DOI 10.1111/j.1095-8649.2006.01061.x.

- Ruzauskas M, Armalyte J, Lastauskiene E, Šiugždiniene R, Klimiene I, Mockeliūnas R, Bartkiene E. 2021.** Microbial and antimicrobial resistance profiles of microbiota in common carps (*Cyprinus carpio*) from aquacultured and wild fish populations. *Animals* 11:1–14 DOI [10.3390/ani11040929](https://doi.org/10.3390/ani11040929).
- Schmieder R, Edwards R. 2011.** Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27(6):863–864 DOI [10.1093/bioinformatics/btr026](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026).
- Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. 2011.** Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology* 12:1–18 DOI [10.1186/gb-2011-12-6-r60](https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60).
- Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, O'Connor MP, Rosen GL, Knight R, Kilham SS, Russell JA. 2012.** Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology* 21(13):3363–3378 DOI [10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x).
- Sweet MJ, Bulling MT. 2017.** On the importance of the microbiome and pathobiome in coral health and disease. *Frontiers in Marine Science* 4(9):1–11 DOI [10.3389/fmars.2017.00009](https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00009).
- Taoka Y, Maeda H, Jo J, Jeon M, Bai SC, Lee W, Yuge K, Koshio S. 2006.** Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Science* 72:310–321 DOI [10.1111/j.1444-2906.2006.01152.x](https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01152.x).
- Tran N-T, Li Z, Ma H, Zhang Y, Zheng H, Gong Y, Li S. 2020.** Clostridium butyricum: a promising probiotic confers positive health benefits in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* 12:2573–2589 DOI [10.1111/raq.12459](https://doi.org/10.1111/raq.12459).
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007.** The human microbiome project. *Nature* 449(7164):804–810 DOI [10.1038/nature06244](https://doi.org/10.1038/nature06244).
- 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* 127:283–292 DOI [10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003).
- Xia Y, Wang M, Gao F, Lu M, Chen G. 2020.** Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Nutrition* 6:69–79 DOI [10.1016/j.aninu.2019.07.002](https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.07.002).



## CAPÍTULO 2

### Efectos de prebióticos y simbióticos sobre el crecimiento y la microbiota intestinal de juveniles de *Chirostoma estor* en cautiverio.

#### Resumen

En la piscicultura comercial, se considera importante mantener el bienestar de los organismos a través de una dieta apropiada. Una alternativa viable para desarrollar un cultivo adecuado es el uso de suplementos prebióticos y probióticos aplicados de forma separada o junta como simbiótico (del inglés synbiotics), siendo la segunda opción la que frecuentemente genera resultados sinérgicos en términos de mejorar las condiciones de cultivo. En este capítulo se investiga los efectos de los prebióticos y simbióticos sobre el crecimiento y la microbiota intestinal de *Chirostoma estor* en etapa juvenil. Peces con un peso y una longitud total promedio de  $5.6 \pm 1.8$  g y  $9.2 \pm 1.0$  cm, respectivamente, fueron alimentados durante 12 semanas, con una dieta testigo (sin suplementos) (dieta 1); una dieta con prebiótico inulina de *Agave tequilana* al 2% (dieta 2), una dieta con prebiótico pared celular de levadura *Saccharomyces cerevisiae* al 0.025% (dieta 3), una dieta adicionada con simbióticos (probiótico *Lactobacillus acidophilus*  $1 \times 10^6$  UFC/g de alimento + prebiótico inulina) (dieta 4) y otra dieta con simbióticos (probiótico *L. acidophilus* + prebiótico pared celular) (dieta 5). En los resultados muestran que el crecimiento (en términos de longitud y peso final) y el factor de condición mejoraron significativamente en los dos tratamientos simbióticos ( $p < 0.05$ ), seguido del prebiótico pared celular. En el análisis de la microbiota, se observa que existe modulación de la microbiota intestinal, donde la abundancia de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Weissella* incrementó de forma significativa con la aplicación de los simbióticos y el prebiótico inulina, en comparación con los tratamientos testigo y prebiótico pared celular. Además, se definió una “core” microbiota que está representada por nueve géneros: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* y *Thermogemmatispora*. El análisis de relación entre microbiota-crecimiento, determinó claramente una relación entre el género *Lactobacillus* y los valores del crecimiento, con una agrupación hacia los tratamientos simbióticos. Por lo tanto, *Lactobacillus* podría influir en el rendimiento del crecimiento de *C. estor* cuando se adiciona en sinergia con inulina y prebióticos de pared celular.

**Palabras clave:** *C. estor*, simbióticos, prebióticos, crecimiento, microbiota intestinal.

**Objetivos específicos capítulo 2**

1. Determinar el efecto de la adición dietética de prebióticos y simbióticos sobre el crecimiento de peces juveniles de *Chirostoma estor*.
2. Evaluar el efecto de prebióticos y simbióticos sobre la microbiota intestinal de peces juveniles de *Chirostoma estor*.
3. Determinar si existe una core microbiota en peces juveniles de *Chirostoma estor* alimentados con dietas adicionadas con prebióticos y simbióticos.
4. Relacionar la microbiota con los parámetros del crecimiento en peces juveniles de *Chirostoma estor* alimentados con prebióticos y simbióticos.

**CAPÍTULO 2****Título del artículo científico:**

**Prebiotics and synbiotics on gut microbiota modulation and growth performance of juvenile pike silverside (*Chirostoma estor* Jordan, 1880)**

Trabajo en borrador para ser revisado por los autores. Se pretende enviar a la revista Aquaculture.

## Prebiotics and synbiotics on gut microbiota modulation and growth performance of juvenile pike silverside (*Chirostoma estor* Jordan, 1880)

Authors: Jesús Mateo Amillano-Cisneros<sup>1</sup>, Yulissa L. Vargas-Huipio, Perla T. Hernandez-Rosas<sup>1</sup>, Bruno Gómez-Gil<sup>2</sup>, Carlos Martínez-Palacios<sup>1</sup>, Luciana Raggi<sup>1,3</sup>, Pamela Navarrete-Ramírez<sup>1,3</sup>, María Gisela Ríos-Durán<sup>1</sup>, C. Cristian Martínez-Chávez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, San Juanito Itz'icuaró, Morelia, Michoacán, México, CP 58330.

<sup>2</sup>CIAD

<sup>3</sup>CONACYT

### Abstract

In commercial fish farming, it is considered essential to maintain the welfare of the organisms through a nutritionally adequate diet. A viable alternative to develop an optimal culture is the use of prebiotic and probiotic supplements applied separately and together as a synbiotic, which frequently generate synergistic results in terms of improved culture conditions. Particularly in endemic species with aquaculture potential, the experimental application of these dietary supplements can be a key factor for successful development under controlled conditions. This study investigated the effects of prebiotics and synbiotics on carcass body, growth and intestinal microbiota in juvenile pike silverside *Chirostoma estor*. A total of 1,695 fish with an average initial weight and total length of 5.6 g  $\pm$  1.8 and 9.2 cm  $\pm$  1.0, respectively were fed diets containing 0% prebiotic and 0% probiotic (control), 2% diet of inulin from *Agave tequilana* and 0.025% diet of cell wall from yeast *Saccharomyces cerevisiae* (prebiotics), *Lactobacillus acidophilus* 10<sup>6</sup> CFU g<sup>-1</sup> + inulin and *L. acidophilus* + cell wall (synbiotics) diets for 12 weeks. Results in carcass composition indicated that protein value was significantly higher in control and *Lactobacillus acidophilus* + cell wall treatments compared than the rest of the diets, whereas lipid value was higher in the cell wall diet. In growth parameters results, the final body length and weight, weight gain, weight gain rate, specific growth rate and condition factor were significantly improved by the synbiotics diets ( $p < 0.05$ ), followed by the cell wall prebiotic. Also, is evident the modulation of the intestinal microbiota, where the abundance of the lactic acid bacteria (LAB) genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* and *Weissella* were statistically increased with the application of these synbiotic supplements compared to the control and prebiotics treatments. A core gut microbiota represented by nine genera was defined: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* and *Thermogemmatispora*. In addition, through the analysis of the relationship between microbiota-growth, an inclination between the *Lactobacillus* genus and growth factors performance was clearly observed, with a grouping towards the synbiotic treatments. Therefore, *Lactobacillus* could influence the growth performance of this fish when added in synergy with inulin and cell wall prebiotics.

**Key words:** *Chirostoma estor*, synbiotics, prebiotics, growth, intestinal microbiota, lactic acid bacteria

## 1. Introduction

Aquaculture is probably the fastest growing food production sector and currently represents about 50% of world fisheries production. Along with the growth of aquaculture, there is human population growth and, according to FAO, by 2050 we will have at least 10 billion people (FAO, 2018). This implies that to solve this problem, the various activities in terms of production and quality of different food resources must be optimized. One of the viable alternatives to increase the performance of farmed fish is the use of feeds supplemented with prebiotics and probiotics. Among the prebiotics used in fish aquaculture, inulin stands out for its wide use and its effects in improving growth and survival, as well as modulating intestinal microbiota (Mahious et al., 2006; Ortiz et al., 2013; Özlüer-Hunt et al., 2019; Yones et al., 2020). Another widely used prebiotic is the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, rich in the presence of  $\beta$ -glucans and mannan oligosaccharides (MOS) (Schiavone et al., 2017), whose effects reported in aquaculture are similar to those presented by inulin (Abu-Elala et al., 2018; Zhang et al., 2020). Probiotics are live microorganisms which, when administered in adequate amounts ( $10^6$ - $10^7$  CFU/g), confer benefit on the host (FAO and WHO, 2006). Among the probiotics applied in fish, the most important effects are the improvement of growth and survival, as well as the modulation of the microbiota by increasing the proportion of lactic acid bacteria (Akter et al., 2019; Gupta et al., 2019; Xia et al., 2020).

The addition of pre- and probiotics in fish diets, optimize the growth and module the gut microbiota (Rodríguez-Estrada et al., 2009; Hasan et al., 2018). It has been determined that when applied together ("synbiotics"), the effects are greater (Gibson and Roberfroid, 1995; Cerezuela et al., 2011). Several prebiotics, probiotics and their combinations as synbiotics have been intensively studied in fish cultured (Irianto and Austin 2002; Ganguly et al., 2010; Guerreiro et al., 2017; Amenyogbe et al., 2020).

Our model of study is pike silverside fish from Lake Patzcuaro *Chirostoma estor*, with an ecological, nutritional, economical and cultural importance in the central Mexico region. The growth of *C. estor* under controlled cultivation conditions is slow, and the influence of prebiotics and synbiotics in terms of performance and the influence that these on the microbiota are unknown. Therefore, the present study aims to determine the influence that different prebiotics and synbiotics as a supplement in the diet have in juvenile *Chirostoma estor* as a viable alternative to improve growth of this fish in farming conditions. Also, the

influence of prebiotics and synbiotics on gut microbiota was determined. The importance of this analysis is to evaluate the modulation of microorganisms by the prebiotics or synbiotics that have an effect in fish, and consequently improve its development in culture.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Experimental design

The study was conducted from the aquaculture biotechnology laboratory of the Laboratorio Nacional de Nutrigenómica, Microbiómica y Digestiva Animal of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico (19° 41' 22" N, 101° 14' 56" W, altitude 1,896 masl).

### 2.2 Probiotics and prebiotics supplement

The probiotic bacteria, *L. acidophilus* La-14 (Danisco's patented, U.S. PATENT 6,653,062/PCTWO02/09515AI) was cultured in a MRS broth at 37°C for 48 hours, centrifuged, and washed with sterile distilled water before adding to the mix for diet preparation. The final density of the bacteria in diets was 10<sup>6</sup> CFU/g in feed for probiotic effect according to its definition (FAO and WHO, 2006). Inulin samples were obtained from local commercial distributor (Transformación e Innovación S.A. de C.V., yuxi) extracted from *Agave tequilana*. Cell wall rich in mannan-oligosaccharides (MOS, min. 22%) and β-glucans (min. 24%) [1,3 and 1,6] was obtained by autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* (SafMannan®, Safmex S.A. de C.V.). The five treatment diets were as follows: a control diet (C), prebiotic inulin 20 g kg<sup>-1</sup> (I), prebiotic cell wall 0.25 g kg<sup>-1</sup> (W), synbiotic *L. acidophilus* La-14 5 g kg<sup>-1</sup> and final concentration of 10<sup>6</sup> CFU g<sup>-1</sup> + inulin 20 g kg<sup>-1</sup> (L+I) and synbiotic *L. acidophilus* La-14 5 g kg<sup>-1</sup> and final concentration of 10<sup>6</sup> CFU g<sup>-1</sup> + cell wall 0.25 g kg<sup>-1</sup> (L+W) (**Table 1**).

### 2.3 Proximate composition analysis

The proximate composition analysis of diets and fish feed with prebiotics and synbiotics were conducted in triplicate, and the proximate composition was determined according to standard methods (Association of Official Analytical Chemists AOAC, 2000). Moisture was determined by drying samples in an oven at 105 °C until a constant weight was achieved. Ash content was estimated by incinerating the samples (~ 1.0 g) in a muffle furnace at 550°C for 8 h. Lipid of sample content (~ 1.0 g) was calculated by the Soxhlet extraction method. Protein

nitrogen (N x 6.25) was determined by incinerating the samples (~ 0.1 g) by the Dumas method. The proximate composition of the experimental diets is shown in **Table 1**. The proximate composition of fish feed with the different diets is presented in **Table 2**.

#### *2.4 Fish culture*

Juveniles of *C. estor* (1,695) with an average weight and a total length of  $5.6 \pm 1.8$  g and  $9.2 \pm 1.0$  cm, respectively and 7 months post-hatching, were stocked in 15 circular tanks with capacity of ~7000 L (3 m diameter x 1 m height) distributed randomly in five treatments (3 tanks/treatment; 113 fish/tank). Fish were acclimated for 2 weeks and fed on a basal diet developed in our laboratory, previous to the beginning of the experiment. During the 12 weeks experiment fish were fed manually *ad libitum* 6 times a day for 9 hours. Temperature (°C) and dissolved oxygen (mg/L) were measured daily. The tanks were maintained in aerated and in open system water flux to maintain water quality.

At the end of the experiment, twenty fish per tank from each treatment were measured and weighed. Immediately, the abdominal cavities of fish were dissected under aseptic conditions, guts were extracted, placed into sterile tubes with 96% ethanol and stored at 4 °C until DNA extraction. All specimens were treated in accordance with EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and the guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (2007/526/EC).

**Table 1.**

Ingredients used and proximate composition of control, probiotics and synbiotics treatments.

Ingredient (g/kg)	Treatments				
	Control	Inulin	Cell wall	<i>Lactobacillus</i> +inulin	<i>Lactobacillus</i> +cell wall
Marine protein sources <sup>1</sup>	423.11	423.11	423.11	423.11	423.11
Soluble protein sources <sup>2</sup>	199.20	199.20	199.20	199.20	199.20
Soy protein isolate	57.97	57.97	57.97	57.97	57.97
Canola oil	3.89	3.89	3.89	3.89	3.89
Corn starch	251.00	231.00	250.75	226.00	245.75
BHT (antioxidant)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Soy Lecitin	19.30	19.30	19.30	19.30	19.30
Vitamin premix*	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Arabic gum	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00
Sodium alginate	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Rovimix Stay C-35*	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40
Crystalline Taurine	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Choline Chloride*	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Mineral premix (Trace elements)*	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Mineral premix (macro elements)*	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Inulin	0.00	20.00	0.00	20.00	0.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> cell wall	0.00	0.00	0.25	0.00	0.25
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <sup>3</sup>	0.00	0.00	0.00	5.00	5.00
Proximate composition (% of wet matter $\pm$ SD)					
Moisture	8.58 $\pm$ 0.01	4.94 $\pm$ 0.17	7.50 $\pm$ 0.17	8.64 $\pm$ 0.09	11.24 $\pm$ 0.14
Ash	12.45 $\pm$ 0.17	14.26 $\pm$ 0.15	12.47 $\pm$ 0.09	14.58 $\pm$ 0.16	14.00 $\pm$ 0.33
Lipid	6.53 $\pm$ 0.03	6.23 $\pm$ 0.24	6.15 $\pm$ 0.18	5.88 $\pm$ 0.15	4.65 $\pm$ 0.26
Protein	41.03 $\pm$ 0.23	42.46 $\pm$ 0.07	41.93 $\pm$ 0.07	40.11 $\pm$ 0.43	39.02 $\pm$ 0.05

<sup>1</sup>Marine protein sources: Brown Fish Meal (Sardine), Krill Meal. <sup>2</sup>Soluble protein sources: Egg albumin, Milk Whey, Calcium caseinate. <sup>3</sup>Final concentration of *Lactobacillus* in *Lactobacillus* + inulin and *Lactobacillus* + cell wall treatments was 1x10<sup>6</sup> CFU g/kg. \*DSM Nutritional products.

## 2.5 Growth performance

After 12 weeks fish performance was evaluated in terms of final body length (FBL), final body weight (FBW), weight gain (WG), weight gain rate (WGR), specific growth rate (SGR), condition factor (CF), feed intake (FI), feed conversion ratio (FCR), feed efficiency (FE) and survival rate (SR).

Indices were calculated as follows:

WG = (final mean body weight - initial mean body weight)

WGR (%) = 100 x [(final mean body weight - initial mean body weight) / initial mean body weight]

SGR = 100 x [(ln (final body weight) – ln (initial body weight) / days]

CF = 100  $\times$  (weight, g) / (body length, cm)<sup>3</sup>

FCR= feed intake (g) / weight gain (g)

FE= weight gain (g) / feed intake (g)

$SR = 100 \times (\text{final number of animals}) / (\text{initial number of animals})$

Growth results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using R software version 4.1.0. Statistically significant differences between the treatments were determined by *post hoc* tests (Kruskal-Wallis and Mann-Witney-Wilcoxon) with a significance level of  $p < 0.05$ .

### 2.6 DNA extraction and sequencing

Metagenomic DNA of fish intestines was extracted with a CTAB extraction protocol (modified from Doyle and Doyle, 1987) by adding lysozyme (100 mg/mL), proteinase k (20 mg/mL), lithium chloride (5M), and sodium acetate (3 M, pH 5.2) to the extraction buffer. After DNA extraction, the V3 variable region of the 16S rRNA gene was PCR-amplified with the primer pair V3-338f and V3-533r (Huse et al., 2008). PCR products were sequenced under standard conditions (300 cycles, 2X150) in an Illumina Miniseq at Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD), Mazatlan, Sinaloa, Mexico.

### 2.7 Bioinformatics

All sequence data have been submitted to NCBI Sequence Read Archive (SRA, SAMN25047428 to SAMN25047469) under BioProject accession ID: [PRJNA796804](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA796804). FastQ files were preprocessed with PrinSeq (Schmieder & Edwards, 2011), reads were assembled and quality filtered with Flash v.1.2.7 software (Magoc and Salzberg, 2011), and VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016) was used for further processing, obtaining an abundance matrix of bacterial OTUs 0.03 (operational taxonomic units clusterized at 97% identity) that was normalized using the metagenomeSeq method (McMurdie and Holmes, 2014) against SILVA138 database (Quast et al., 2013). The abundance matrix at the genus taxonomic level was used to calculate coverage and alpha diversity indexes (Chao1 and Shannon indexes), which were estimated using the R Phyloseq library (McMurdie and Holmes, 2013). The genus level abundance matrix was normalized using the metagenomeSeq method (McMurdie and Holmes, 2014), and the beta diversity distance matrix was calculated using Bray-Curtis dissimilarity. The distance matrices (beta diversity) were visualized with Non-metric Multidimensional Scaling plot (NMDS) of bacterial data grouped by treatments, and the ordination was based on between-sample dissimilarities calculated by Bray-Curtis distance and 999 permutations using library vegan 2.5-6 (Oksanen et al., 2019) in R software (R Core



Team, 2013). The core gut microbiota was calculated from genera occupancy at least 80% of samples per treatment as have been used in other studies (Baldo et al., 2015; do ValePereira et al 2017; Sweet & Bulling, 2017; Rimoldi et al., 2019). The visualization by UpSet plot which represents the core microbiota was drawn using the package UpSetR (Conway et al., 2017) in R software (R Core Team, 2013).

### *2.8 Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using R software (R Core Team, 2013) and R library vegan 2.5-6 (Oksanen et al., 2019). Alpha diversity and relative abundance data were tested for normality and homogeneity of variances by Shapiro–Wilk’s and Bartlett’s tests, respectively. Alpha diversity data (Chao1 richness and Shannon diversity indexes) were grouped by treatment to be considered for statistical analysis. To determine statistical differences between treatments (beta diversity), a non-metric dimensional scaling method (NMDS) in conjunction with Bray-Curtis distances (Bray and Curtis, 1957) was performed and also Analysis of Similarities (ANOSIM) and Adonis tests (Permutational Multivariate Analysis of Variance, PERMANOVA) using Bray-Curtis index at 999 permutations. The number of reads across samples was normalized by sample size and the relative abundance (%) of each taxon was calculated. Although results are generated for each taxa level, only Phylum and genus levels are shown. Taxa with the highest relative abundance were considered for statistical analysis, 10 for phylum and 30 per genus level. Phylum and genus abundance data were not normal. Not-normal data were analysed by nonparametric Kruskal–Wallis followed by Mann-Witney-Wilcoxon’s post hoc test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Additional analysis to detect differential abundance was performed using the Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) method (Segata et al., 2011) integrated within the Galaxy framework (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>). In particular, the non-parametric Kruskal-Wallis sumrank test was used to detect differentially abundant taxa, and Linear Discriminant Analysis (LDA) was used to estimate the effect size.

### *2.9 Core microbiota analysis*

Core microbiota was calculated identified at the level of the genus when they were present in at least 80% of samples per treatment (Baldo et al., 2015; do ValePereira et al 2017; Sweet & Bulling, 2017; Rimoldi et al., 2019). The visualization by UpSet plot, which represents the

core microbiota, was drawn using the package UpSetR (Conway et al., 2017) in R software (R Core Team, 2013).

### *2.10 Predictive functional analysis by PICRUSt2*

The functional profiles from 16S rRNA data were predicted using the Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2 (PICRUSt2) v2.3.0 beta software (Douglas et al., 2019). PICRUSt2 is a wraparound workflow which uses HMMER ([www.hmmer.org](http://www.hmmer.org)) to place ASVs (Amplicon Sequence Variants) into a reference phylogeny, EPA-NG and gappa, followed by the castor R package to predict gene family abundances using hidden-state prediction. Metagenomes are then predicted based on study sequence abundances normalized by predicted 16S copy numbers and gene family abundances. Pathway abundances are inferred based on the predicted sample functional profiles that can be linked to reactions within pathways using a modified version of MinPath. Afterwards, pathway abundances are inferred with KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (`pathway_pipeline.py`).

The output file (`path_abun_unstrat_descrip.tsv`) of predicted pathway abundances was then loaded to R software (R Core Team, 2013). Then, the 60 most abundant functional pathways (taking into account the total average of the samples) were visualized using a heatmap by ComplexHeatmap package (Gu, Eils & Schlesner, 2016) in R package. To determine specific differences (between each of the predicted paths), the output file of PICRUSt2 (`path_abun_unstrat_descrip.tsv`) was loaded in MEGAN5 package (Huson et al., 2016) to define metabolic categories and afterwards analyzed in STAMP (statistical analysis of taxonomic and functional profiles) (Parks et al., 2014) software. This program permitted the further statistical interrogation of all predicted functional datasets and the production of graphical depictions of key functional pathway data. The five treatment groups (C-I-W-L+I-L+W) were compared using a two-sided Welch's t test. Pathways with a  $p$  value  $< 0.05$  were considered as statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1 Carcass composition

The final mean carcass composition of pike silverside of the different treatments is presented in **Table 3**. There were differences in lipid and protein parameters between treatments. In the lipid analysis, the cell wall diet was significantly higher than the rest of the treatments. While, the control and *Lactobacillus acidophilus* + cell wall treatments were higher in protein than the rest of the diets (**Table 2**).

#### **Table 2.**

Proximate carcass composition of *C. estor* at different treatments (% on a wet matter basis  $\pm$  SD). **Legends:** control (C), inulin (I), cell wall of *S. cerevisiae* (W), (*Lactobacillus acidophilus* + inulin (L+I), *L. acidophilus* + cell wall (L+W).

Treatments	Moisture	Ash	Lipid	Protein
C	76.95 $\pm$ 0.47 <b>a</b>	2.88 $\pm$ 0.19 <b>a</b>	4.74 $\pm$ 0.10 <b>b</b>	16.11 $\pm$ 0.55 <b>a</b>
I	77.36 $\pm$ 0.09 <b>a</b>	2.8 $\pm$ 0.15 <b>a</b>	4.66 $\pm$ 0.23 <b>b</b>	15.03 $\pm$ 0.17 <b>b</b>
W	76.57 $\pm$ 0.74 <b>a</b>	2.57 $\pm$ 0.06 <b>a</b>	5.84 $\pm$ 0.09 <b>a</b>	15.23 $\pm$ 0.07 <b>b</b>
L+I	78.28 $\pm$ 0.77 <b>a</b>	2.77 $\pm$ 0.10 <b>a</b>	4.5 $\pm$ 0.05 <b>b</b>	15.09 $\pm$ 0.18 <b>b</b>
L+W	76.97 $\pm$ 1.25 <b>a</b>	2.68 $\pm$ 0.18 <b>a</b>	4.47 $\pm$ 0.29 <b>b</b>	15.58 $\pm$ 0.08 <b>a</b>

#### 3.2 Growth performance

After 12 weeks of experiment, fish fed with *L. acidophilus* + inulin and *L. acidophilus* + cell wall (both synbiotics diets) presented the highest final body length and weight, which was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than fish fed with the control and inulin diets (**Table 3**). Also, prebiotic cell wall diet was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than fish fed with the control and inulin treatments (**Table 3**). The results showed that the WG, WGR, SGR and FE have the same effects by synbiotics and cell wall treatments (**Table 3**). The feed conversion ratio was more efficient in synbiotics and cell wall treatments, which was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than fish fed with the control and inulin diets (**Table 3**).

**Table 3.**

Mean values and standard deviations for variables of zootechnical performance of pike silverside *C. estor*, fed with control (C), prebiotics (inulin, I; cell wall of *S. cerevisiae*, W) and synbiotics (*Lactobacillus acidophilus* + inulin, L+I; *L. acidophilus* + cell wall, L+W) diets for 12 weeks.

	Treatment				
	C	I	W	L+I	L+W
FBL (cm)	12.03 ± 0.81 c	12.11 ± 0.93 c	12.88 ± 0.78 b	13.59 ± 0.92 a	13.59 ± 0.68 a
FBW (g)	11.76 ± 2.78 c	12.02 ± 2.86 c	15.44 ± 3.07 b	17.68 ± 2.49 a	16.91 ± 3.49 a
WG (g)	6.14 ± 2.78 c	6.40 ± 2.86 c	9.81 ± 3.07 b	12.06 ± 2.49 a	11.29 ± 3.49 a
WGR (%)	109.16 ± 49.47 c	113.88 ± 50.86 c	174.64 ± 54.67 b	214.59 ± 44.36 a	200.86 ± 62.09 a
SGR	0.85 ± 0.26 c	0.87 ± 0.27 c	1.18 ± 0.23 b	1.35 ± 0.17 a	1.29 ± 0.23 a
CF	96.72 ± 16.10 c	98.47 ± 17.21 c	118.94 ± 16.75 b	129.82 ± 13.94 a	123.60 ± 19.50 b
FI	12.23 ± 0.48 a	13.24 ± 0.65 a	13.04 ± 0.79 a	14.71 ± 2.61 a	12.61 ± 1.38 a
FCR	2.42 ± 1.17 a	2.49 ± 1.13 a	1.46 ± 0.46 b	1.28 ± 0.36 c	1.21 ± 0.33 c
FE	0.50 ± 0.22 c	0.48 ± 0.22 c	0.75 ± 0.23 b	0.84 ± 0.21 a	0.89 ± 0.25 a
SR (%)	98.82 ± 1.35 a	98.23 ± 0.88 a	99.12 ± 0.88 a	98.82 ± 0.51 a	99.41 ± 0.51 a

Different letters per row indicate statistical significance between treatments ( $p < 0.05$ ).

\* FBL, final body length; FBW, final body weight; WG, weight gain in grams; WGR, weight gain (%); SGR, specific growth rate; CF, condition factor; FI, feed intake; FCR, feed conversion ratio; FE, feed efficiency; SR, survival rate.

### 3.3 Microbiota analysis

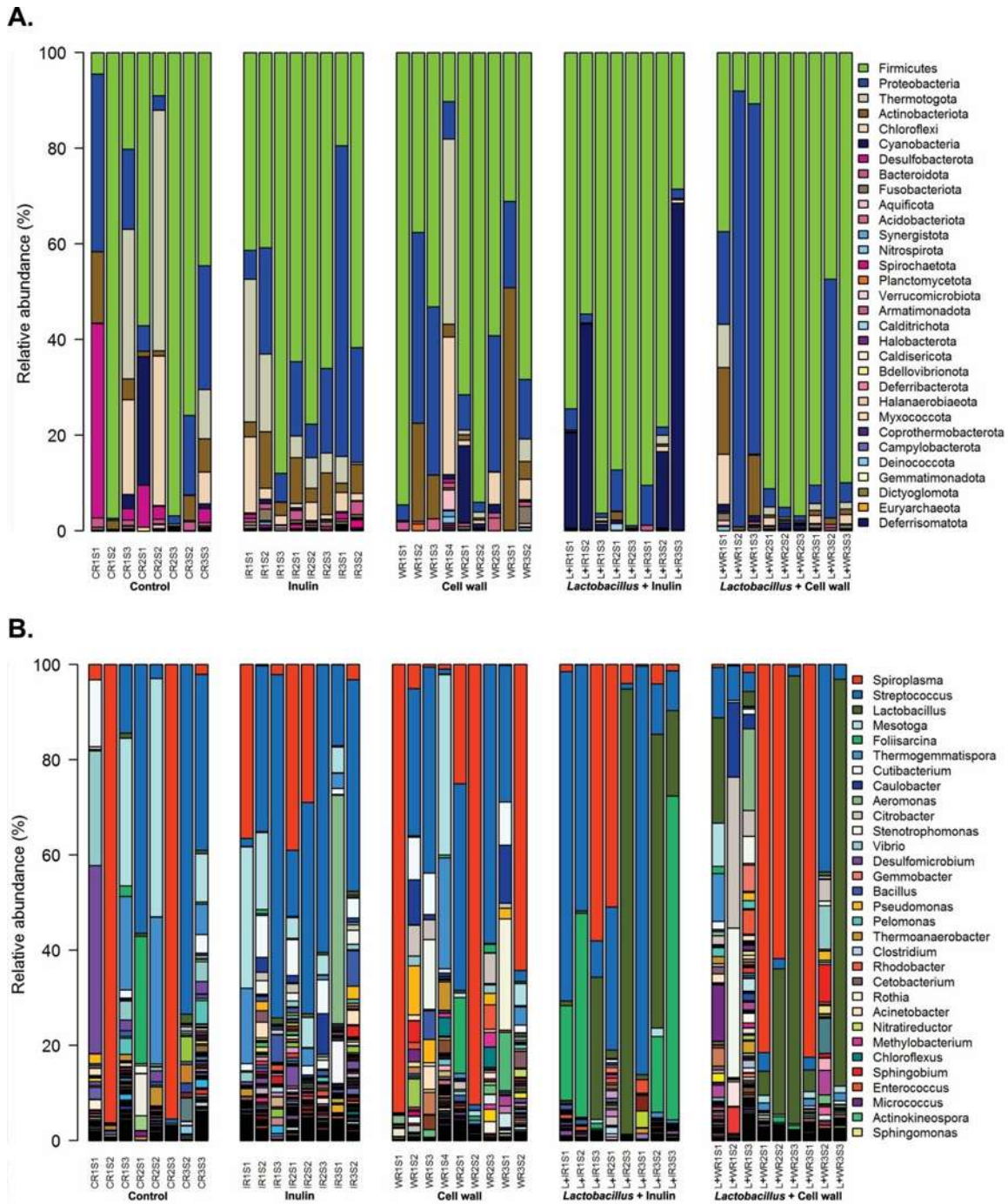
At phylum level there is a constant presence of Firmicutes (60.99 ± 4.68%), Proteobacteria (16.72 ± 3.23%) (Class Gammaproteobacteria (12.53 ± 2.63%) and Alphaproteobacteria (4.19 ± 0.91%)), Thermotogota (5.31 ± 1.76%), Actinobacteriota (5.03 ± 1.37%), Cyanobacteria (4.97 ± 2.04%) and Chloroflexi (3.58 ± 1.13%) (**Fig. 1A**; Supplementary Table 1). The most abundant bacteria genera are *Streptococcus* (24.46 ± 3.93%), *Spiroplasma* (22.37 ± 5.20%), *Lactobacillus* (11.03 ± 3.91%), *Mesotoga* (5.25 ± 1.74%), *Foliisarcina* (4.84 ± 2.03%), *Thermogemmatispora* (3.06 ± 1.06%), *Cutibacterium* (2.14 ± 0.53%), *Citrobacter* (1.78 ± 0.78%), *Aeromonas* (1.73 ± 1.20%), *Stenotrophomonas* (1.62 ± 0.82%) and *Caulobacter* (1.46 ± 0.54%) (**Fig. 1B**; **Table 4**).

### 3.4 Alpha diversity analysis

Alpha-diversity of samples per condition (treatments) show significant differences in microbiota diversity (Shannon's Index) in gut, where cell wall diet was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than *Lactobacillus acidophilus* + inulin diet (Supplementary Table 2).

### 3.5 Beta diversity analysis

Analysis of beta diversity using non-metrical dimensional scaling method (NMDS), revealed an overlapping of some samples of all treatments and a marked clustering between most samples in the cell wall and *Lactobacillus* + cell wall treatments (**Fig. 2B**). These similarities are statistically supported by ANOSIM:  $R = 0.05908$ ,  $p = 0.071$  (**Fig. 2B**; Supplementary Table 3). However, there are significant differences between treatments I vs. L+I and W vs. L+I analyzed by PERMANOVA ( $p = 0.015$  and  $p = 0.040$ , respectively) (Supplementary Table 3).

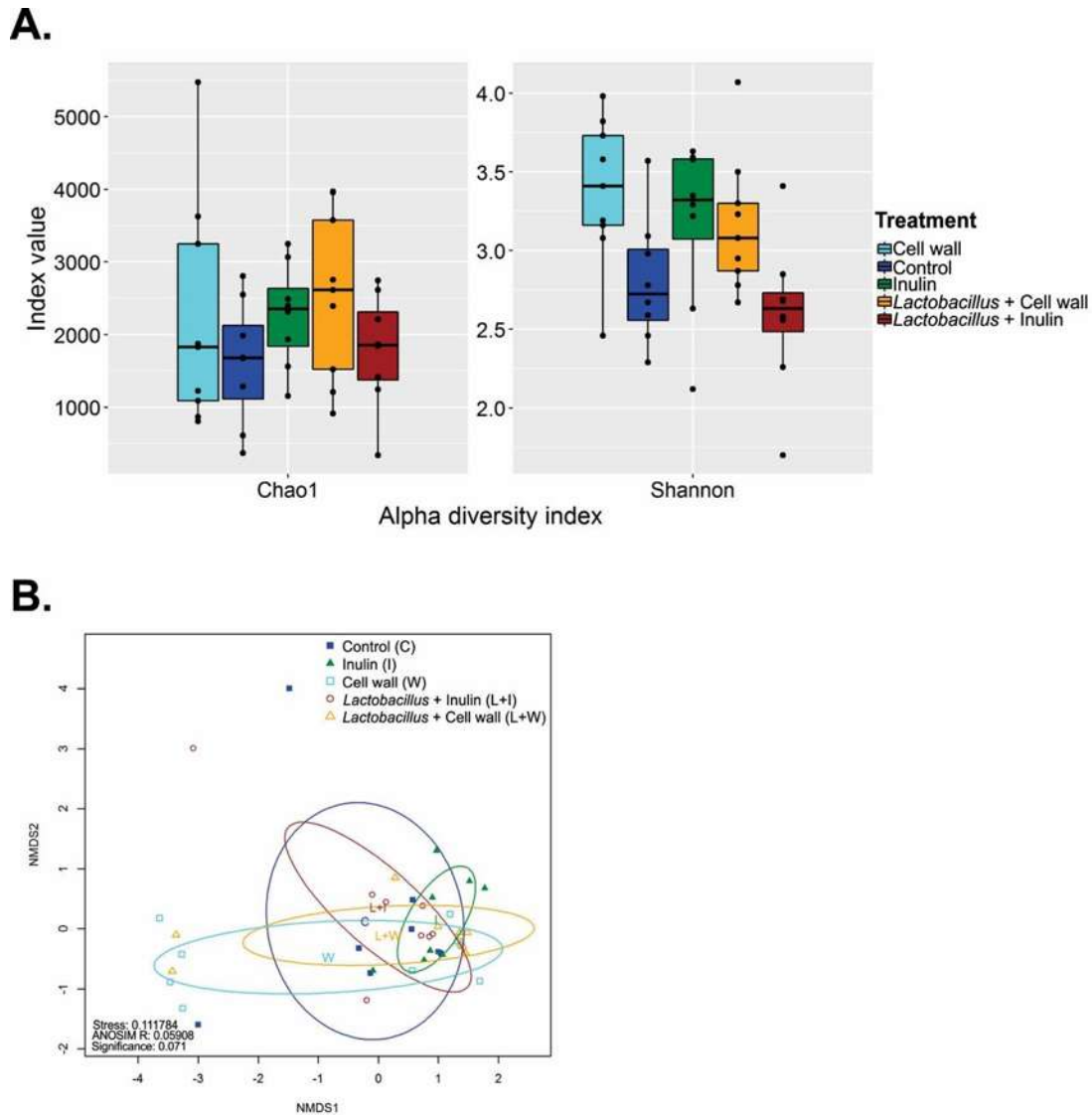


**Fig. 1.** Relative abundance of gut microbiota of pike silverside fed with control, prebiotics (inulin, cell wall) and synbiotics (*Lactobacillus acidophilus* + inulin, *L. acidophilus* + cell wall) treatments in Phylum level (A) and in genus level (B).

**Table 4.**

Total mean (%) relative abundance (first column)  $\pm$  SE, and mean relative abundance  $\pm$  SE of the 30 genus prevalent found in gut samples of pike silverside seed with control, prebiotics and synbiotics. **Legends:** Control, C; Inulin, I; Cell wall, W; *Lactobacillus acidophilus* + inulin, L+I; *L. acidophilus* + cell wall, L+W. Different letters per row indicate statistical significance between treatments abundances ( $p < 0.05$ ).

Genus	Total abundance (N=42)	Treatment				
		C (N=8)	I (N=8)	W (N=9)	L+I (N=8)	L+W (N=9)
<i>Streptococcus</i>	24.46 $\pm$ 3.93	23.13 $\pm$ 10.25 <b>ab</b>	36.09 $\pm$ 8.52 <b>a</b>	23.31 $\pm$ 7.53 <b>ab</b>	33.07 $\pm$ 11.36 <b>a</b>	8.81 $\pm$ 4.44 <b>b</b>
<i>Spiroplasma</i>	22.37 $\pm$ 5.20	24.65 $\pm$ 15.56 <b>a</b>	13.80 $\pm$ 6.26 <b>a</b>	31.42 $\pm$ 13.60 <b>a</b>	15.05 $\pm$ 8.66 <b>a</b>	25.43 $\pm$ 12.62 <b>a</b>
<i>Lactobacillus</i>	11.03 $\pm$ 3.91	0.54 $\pm$ 0.24 <b>bc</b>	0.53 $\pm$ 0.15 <b>b</b>	0.18 $\pm$ 0.06 <b>c</b>	25.92 $\pm$ 12.26 <b>a</b>	27.31 $\pm$ 12.32 <b>a</b>
<i>Mesotoga</i>	5.25 $\pm$ 1.74	11.47 $\pm$ 6.70 <b>ab</b>	8.34 $\pm$ 3.53 <b>a</b>	4.96 $\pm$ 4.14 <b>ab</b>	0.35 $\pm$ 0.23 <b>b</b>	1.60 $\pm$ 0.96 <b>ab</b>
<i>Foliusarcina</i>	4.84 $\pm$ 2.03	3.75 $\pm$ 3.31 <b>a</b>	0.21 $\pm$ 0.10 <b>a</b>	2.18 $\pm$ 1.72 <b>a</b>	18.51 $\pm$ 8.85 <b>a</b>	0.45 $\pm$ 0.20 <b>a</b>
<i>Thermogemmatispora</i>	3.06 $\pm$ 1.06	7.13 $\pm$ 4.16 <b>a</b>	3.04 $\pm$ 1.89 <b>ab</b>	3.24 $\pm$ 2.54 <b>ab</b>	0.33 $\pm$ 0.14 <b>b</b>	1.73 $\pm$ 1.08 <b>b</b>
<i>Cutibacterium</i>	2.14 $\pm$ 0.53	2.57 $\pm$ 1.71 <b>ab</b>	4.05 $\pm$ 1.18 <b>a</b>	3.29 $\pm$ 1.42 <b>ab</b>	0.21 $\pm$ 0.09 <b>b</b>	0.61 $\pm$ 0.17 <b>b</b>
<i>Citrobacter</i>	1.78 $\pm$ 0.78	0.28 $\pm$ 0.11 <b>b</b>	0.83 $\pm$ 0.27 <b>b</b>	2.26 $\pm$ 0.91 <b>a</b>	0.09 $\pm$ 0.05 <b>b</b>	5.00 $\pm$ 3.41 <b>a</b>
<i>Aeromonas</i>	1.73 $\pm$ 1.20	0.11 $\pm$ 0.08 <b>b</b>	6.17 $\pm$ 5.98 <b>a</b>	0.27 $\pm$ 0.19 <b>ab</b>	0.05 $\pm$ 0.02 <b>b</b>	2.15 $\pm$ 1.87 <b>ab</b>
<i>Stenotrophomonas</i>	1.62 $\pm$ 0.82	0.35 $\pm$ 0.19 <b>ab</b>	1.24 $\pm$ 0.45 <b>a</b>	1.79 $\pm$ 1.61 <b>ab</b>	0.01 $\pm$ 0.00 <b>b</b>	4.35 $\pm$ 3.43 <b>a</b>
<i>Caulobacter</i>	1.46 $\pm$ 0.54	0.13 $\pm$ 0.07 <b>b</b>	1.94 $\pm$ 1.01 <b>a</b>	2.68 $\pm$ 1.56 <b>a</b>	0.09 $\pm$ 0.06 <b>b</b>	2.20 $\pm$ 1.72 <b>a</b>
<i>Vibrio</i>	1.31 $\pm$ 0.61	4.17 $\pm$ 2.92 <b>a</b>	0.69 $\pm$ 0.25 <b>a</b>	0.65 $\pm$ 0.26 <b>a</b>	0.02 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	1.13 $\pm$ 1.01 <b>a</b>
<i>Desulfomicrobium</i>	1.16 $\pm$ 0.94	5.86 $\pm$ 4.83 <b>a</b>	0.16 $\pm$ 0.10 <b>b</b>	0.00 $\pm$ 0.00 <b>c</b>	0.05 $\pm$ 0.02 <b>b</b>	0.00 $\pm$ 0.00 <b>c</b>
<i>Pseudomonas</i>	0.80 $\pm$ 0.28	0.37 $\pm$ 0.25 <b>ab</b>	0.76 $\pm$ 0.36 <b>a</b>	2.24 $\pm$ 1.15 <b>ab</b>	0.03 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	0.46 $\pm$ 0.26 <b>ab</b>
<i>Bacillus</i>	0.77 $\pm$ 0.25	0.36 $\pm$ 0.17 <b>b</b>	2.16 $\pm$ 0.99 <b>a</b>	0.84 $\pm$ 0.67 <b>b</b>	0.39 $\pm$ 0.16 <b>ab</b>	0.15 $\pm$ 0.04 <b>b</b>
<i>Rothia</i>	0.59 $\pm$ 0.56	0.00 $\pm$ 0.00 <b>ab</b>	0.05 $\pm$ 0.04 <b>ab</b>	2.69 $\pm$ 2.59 <b>a</b>	0.00 $\pm$ 0.00 <b>b</b>	0.00 $\pm$ 0.00 <b>ab</b>
<i>Acinetobacter</i>	0.50 $\pm$ 0.16	0.36 $\pm$ 0.19 <b>a</b>	0.88 $\pm$ 0.50 <b>a</b>	0.75 $\pm$ 0.54 <b>a</b>	0.09 $\pm$ 0.04 <b>a</b>	0.41 $\pm$ 0.22 <b>a</b>
<i>Pelomonas</i>	0.49 $\pm$ 0.15	1.20 $\pm$ 0.67 <b>a</b>	0.44 $\pm$ 0.12 <b>a</b>	0.19 $\pm$ 0.10 <b>ab</b>	0.06 $\pm$ 0.02 <b>b</b>	0.57 $\pm$ 0.24 <b>ab</b>
<i>Thermoanaerobacter</i>	0.44 $\pm$ 0.17	0.69 $\pm$ 0.51 <b>a</b>	0.40 $\pm$ 0.19 <b>a</b>	0.75 $\pm$ 0.66 <b>a</b>	0.05 $\pm$ 0.03 <b>b</b>	0.29 $\pm$ 0.16 <b>a</b>
<i>Micrococcus</i>	0.41 $\pm$ 0.29	0.05 $\pm$ 0.04 <b>ab</b>	0.07 $\pm$ 0.02 <b>a</b>	0.33 $\pm$ 0.29 <b>ab</b>	0.00 $\pm$ 0.00 <b>b</b>	1.45 $\pm$ 1.30 <b>ab</b>
<i>Sphingobium</i>	0.41 $\pm$ 0.22	0.04 $\pm$ 0.02 <b>b</b>	0.40 $\pm$ 0.29 <b>a</b>	0.60 $\pm$ 0.49 <b>a</b>	0.01 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	0.93 $\pm$ 0.86 <b>a</b>
<i>Cetobacterium</i>	0.40 $\pm$ 0.10	0.15 $\pm$ 0.08 <b>bc</b>	0.80 $\pm$ 0.25 <b>a</b>	0.51 $\pm$ 0.37 <b>b</b>	0.05 $\pm$ 0.03 <b>c</b>	0.46 $\pm$ 0.17 <b>ab</b>
<i>Actinokineospora</i>	0.38 $\pm$ 0.29	0.03 $\pm$ 0.03 <b>ab</b>	0.30 $\pm$ 0.13 <b>a</b>	1.40 $\pm$ 1.35 <b>ab</b>	0.00 $\pm$ 0.00 <b>b</b>	0.08 $\pm$ 0.04 <b>ab</b>
<i>Enterococcus</i>	0.37 $\pm$ 0.08	0.12 $\pm$ 0.05 <b>c</b>	0.52 $\pm$ 0.16 <b>ab</b>	0.30 $\pm$ 0.16 <b>abc</b>	0.80 $\pm$ 0.32 <b>a</b>	0.14 $\pm$ 0.05 <b>c</b>
<i>Rhodobacter</i>	0.25 $\pm$ 0.17	0.00 $\pm$ 0.00 <b>b</b>	0.01 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	0.60 $\pm$ 0.57 <b>a</b>	0.01 $\pm$ 0.00 <b>b</b>	0.57 $\pm$ 0.56 <b>a</b>
<i>Chloroflexus</i>	0.24 $\pm$ 0.14	0.09 $\pm$ 0.04 <b>b</b>	0.07 $\pm$ 0.03 <b>b</b>	0.95 $\pm$ 0.60 <b>a</b>	0.00 $\pm$ 0.00 <b>c</b>	0.04 $\pm$ 0.02 <b>bc</b>
<i>Gemmobacter</i>	0.19 $\pm$ 0.13	0.02 $\pm$ 0.01 <b>c</b>	0.09 $\pm$ 0.03 <b>ab</b>	0.04 $\pm$ 0.02 <b>c</b>	0.15 $\pm$ 0.14 <b>bc</b>	0.62 $\pm$ 0.61 <b>bc</b>
<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	0.17 $\pm$ 0.08	0.12 $\pm$ 0.06 <b>a</b>	0.11 $\pm$ 0.07 <b>a</b>	0.44 $\pm$ 0.34 <b>a</b>	0.10 $\pm$ 0.08 <b>a</b>	0.04 $\pm$ 0.02 <b>a</b>
<i>Nitratireductor</i>	0.14 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.05 <b>bc</b>	0.23 $\pm$ 0.08 <b>a</b>	0.22 $\pm$ 0.19 <b>abc</b>	0.02 $\pm$ 0.01 <b>c</b>	0.13 $\pm$ 0.04 <b>ab</b>
<i>Clostridium</i>	0.09 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.06 <b>a</b>	0.11 $\pm$ 0.04 <b>a</b>	0.04 $\pm$ 0.02 <b>a</b>	0.09 $\pm$ 0.03 <b>a</b>	0.12 $\pm$ 0.07 <b>a</b>



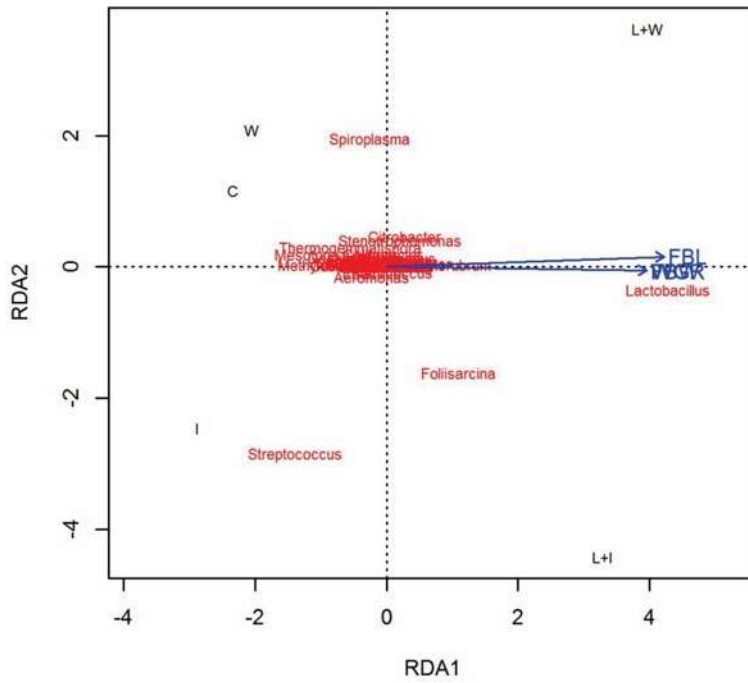
**Fig. 2.** Richness Chao1 and Shannon diversity Index (A) and Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) plot (B) between treatments control, prebiotics and synbiotics, calculated with OTUs data.

### 3.6 Relation between microbiota and growth performance

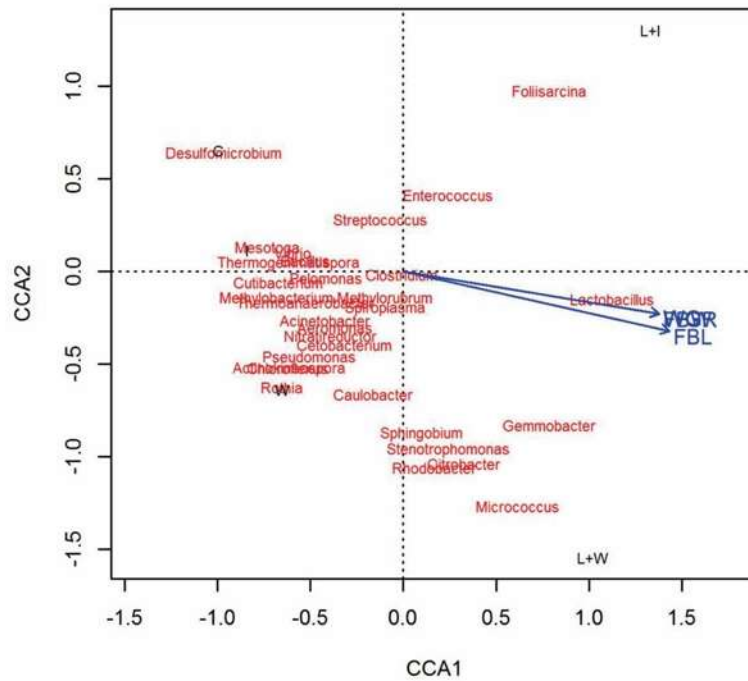
Redundancy Analysis (RDA) was used to identify the relationship between microbiota on growth effects (**Fig. 3A**). *Lactobacillus* spp. presence was positively correlated with growth and factors related as WG, SGR, CF, FI, FCR and FE. A Canonical Correspondence Analysis (CCA) verified the result that this genus was correlated with the growth factors (**Fig. 3B**).



**A.**



**B.**



**Fig. 3.** RDA (A) and CCA (B) analysis relationship microbiota-growth fish. Blue words represent the growth and factor related to these measures. Red words represent the 30 genus more abundantes between treatments. Black words represent the different treatments.

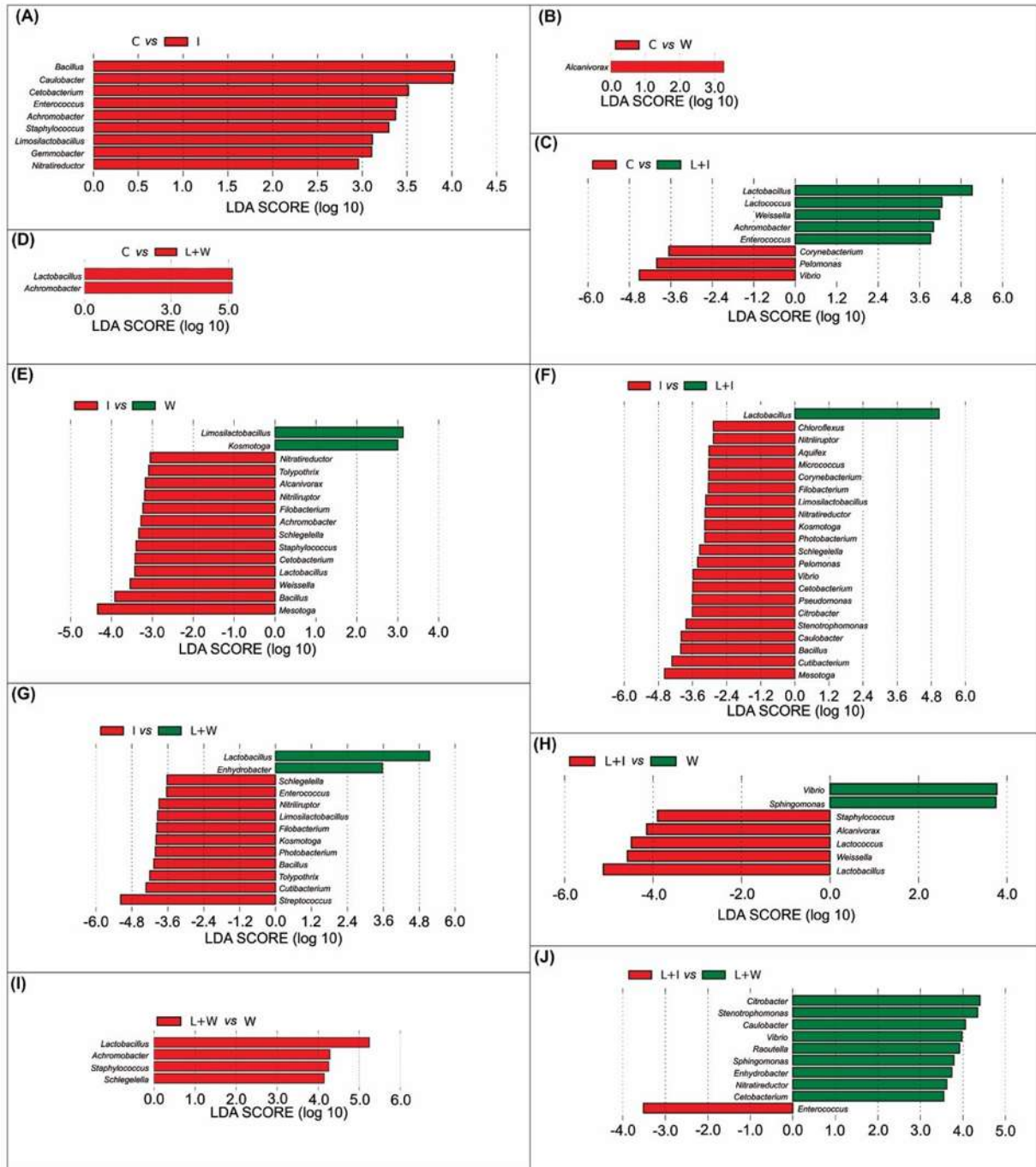
### 3.7 Differential abundance of taxonomic groups

In total, 14 phyla and 56 genera present in at least the 50% of samples (N= 42) of all five treatments were analyzed, showing significant differences when paired comparisons between treatments were performed.

LEfSe analysis revealed differential abundance of more number phyla in the Control (C) and Inulin (I) treatments compared with Cell wall (W), *Lactobacillus* + Inulin (L+I) and *Lactobacillus* + Cell wall (L+W) treatments (C vs I, 1 vs 1; C vs W, 1 vs 0; C vs L+I, 3 vs 0; C vs L+W, 1 vs 0; I vs W, 2 vs 0; I vs L+I, 10 vs 0; I vs L+W, 2 vs 0) (Supplementary Fig. 1A-G). The W and L+W treatments had one phyla more abundant compared to L+I treatment (Supplementary Fig. 1H-I). L+I treatment showed the lowest amounts of phyla when compared with other treatments. In genus level analysis, the results indicates the Control and Cell Wall treatments shown the lowest amounts of genus when is compared with others treatments (C vs I, 0 vs 9; C vs L+I, 3 vs 5; C vs L+W, 0 vs 3; W vs I, 2 vs 13; W vs L+I, 2 vs 5; W vs L+W, 0 vs 4), except Control vs cell wall treatment, where only one genus was found in Control and none in Cell wall treatment (**Fig. 4A-E and H-I**). In contrast, Inulin treatment had the largest number of abundant genera compared to Control (0), Cell wall (2), *Lactobacillus* + Inulin (1) and *Lactobacillus* + Cell wall (2) treatments (**Fig. 4A and E-G**). The synbiotics treatments (L+I and L+W) had more abundant genera compared to Control (5 vs 3 and 3 vs 0) and Cell wall (5 vs 2 and 4 vs 0) (**Fig. 4C-D and H-I**). Also, the synbiotic treatment L+W had more abundant genera compared to other synbiotic treatment L+I (9 vs 1) (**Fig. 4J**).

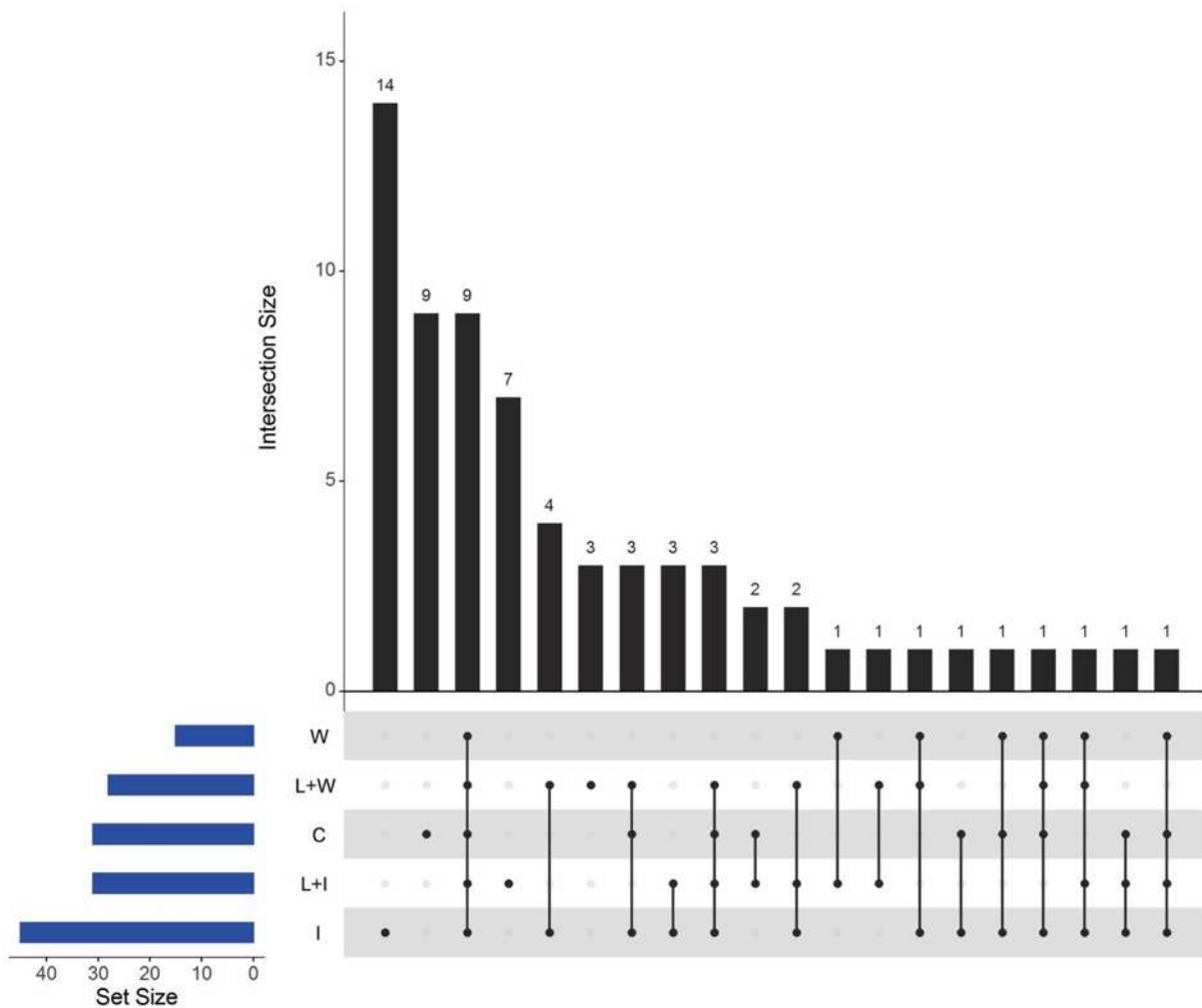
### 3.8 Core microbiota analysis

The core microbiota has been determined according to the presence of each genus at least 80% samples of gut of each of six treatments. This core microbiota has been determined by UpSet plot (**Fig. 5**), where the intercept of genera in the five treatments represents the core microbiota. A core microbiota of nine annotated genera was identified, consisting of *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* and *Thermogemmatipora*.



**Fig. 4.** Comparison of LDA effect size of the significantly differentiating microbial genus deduced using LEfSe analysis among all control, prebiotics and synbiotics treatments (C, Control; I, Inulin; W, Cell wall; L+I, *Lactobacillus acidophilus* + Inulin; L+W, *L. acidophilus* + Cell wall). A). Differences in abundance of treatments C versus I; B). Differences in abundance of treatments C versus W; C). Differences in abundance of treatments C versus L+I; D). Differences in abundance of treatments C versus L+W; E). Differences in abundance of treatments I versus W; F). Differences in abundance of treatments I versus L+I; G). Differences in abundance of treatments I versus L+W; H). Differences in abundance of

treatments W versus L+I; I). Differences in abundance of treatments W versus L+W; J). Differences in abundance of treatments L+I versus L+W. Differentiating feature analysis was carried out with Kruskal-Wallis test raw p-value cutoff = 0.05.



**Fig. 5.** UpSet plot representing the presence of genus in control, prebiotics and synbiotics treatments. Control (C), Inulin (I), Cell wall (W), *Lactobacillus acidophilus* + Inulin (L+I), *L. acidophilus* + Cell wall (L+W).

### 3.9 Functional metagenomics prediction by PICRUSt2

A total of 429 functional pathways were found in all 42 analyzed samples of five treatments. Of these, the 60 most abundant and differentially expressed were analyzed and represented in Supplementary Fig. 2. Over-expressed genes involved in different pathways were observed

mainly in samples of cell wall and *Lactobacillus*+Inulin treatments (Supplementary Fig. 2). The majority of the predicted functional KOs pathways were found to belong to four main categories: (i) Metabolism, (ii) Genetic Information Processing, (iii) Environmental Information Processing and (iv) Cellular Processes.

Within the metabolic pathways, increase in genes presence associated with amino acid, carbohydrate, energy, nucleotide, cofactors and vitamins metabolism, and membrane transport and translation are noted mainly in intestine samples from *Lactobacillus* + Inulin, cell wall and control treatments (Supplementary Figs. 3 and 4). Also, differential regulation in the specific pathways and statistical differences of predicted pathways in the different treatments are shown in Supplementary Fig. 5.

#### **4. Discussion**

In the present results, the application of the prebiotics inulin and cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* reduced the percentage of proteins in the body composition of *Chirostoma estor*. While cell wall increased the percentage of lipids with respect to the control treatment. These prebiotics had no significant effect on the percentages of moisture and ash when compared to the control treatment. In contrast, Hoseinifar et al. (2011) used cell wall of *S. cerevisiae* as a prebiotic in the diet of beluga *Huso huso* and reported that there was no significant effect on body composition of protein, lipid, and ash. Piccolo et al. (2013) used inulin and mannan oligosaccharides (MOS) as prebiotics in the diet of sharp snout seabream *Diplodus puntazo* and reported significant differences in the reduction of lipid and ash content when compared to the control treatment. Also, they found that these prebiotics increased the percentage of moisture. In other studies, Tiengtam et al. (2015) and Özlüer-Hunt et al. (2019) when adding inulin in the diet of Nile tilapia *O. niloticus* and rainbow trout *O. mykiss*, respectively, found that there was no significant effect on the composition of moisture, protein, lipid and ash when compared to the control treatment.

In the present work, the results of the application of the synbiotics, *Lactobacillus* + inulin decreased the percentage of protein in the carcass composition compared to the control treatment and had no significant effect on the percentages of moisture, lipids, and ash when compared to the control treatment. While *Lactobacillus* + cell wall had no effect on proximal composition compared to the control treatment. Dawood et al. (2019) used *Aspergillus fungus*

and  $\beta$ -glucans as synbiotics in the diet of Nile tilapia *O. niloticus* and reported significant differences in the reduction of protein percentage compared to the control treatment. In contrast, Mehrabi et al. (2011) when adding the synbiotic *Enterococcus faecium* and Fructooligosaccharides (FOS) in the diet of rainbow trout *O. mykiss*, noted significant differences in the increase of protein percentage and reduction of ash percentage compared to the control treatment. In another study, Ye et al. (2011) when applying the synbiotics *Bacillus clausii* + FOS and *B. clausii* + FOS + MOS in the diet of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, noted the same results in the percentage of protein compared to the control treatment.

There are also studies where the application of synbiotics in fish has no effect on the proximal composition. Rodriguez-Estrada et al. (2009) when applying *Enterococcus faecalis* + MOS in rainbow trout *O. mykiss*, found that there was no significant effect on moisture, protein, lipid, and ash composition when compared to the control treatment. In more recent studies, Hasan et al. (2018) by adding *Bacillus* sp. +  $\beta$ -glucanooligosaccharide in Japanese flounder *P. olivaceus* and Lee et al. (2018) by adding *B. subtilis* + MOS in Japanese eel *Anguilla japonica*, found that there was no significant effect on moisture, protein, lipid and ash composition when compared to the control treatment. As mentioned by Kumar et al. (2017), higher protein concentrations in fish fed with synbiotics imply that the ingested feed is more efficiently converted to structural protein, whose result is higher muscle growth. However, in *Chirostoma estor* we found that the percentage of protein was higher in the control and *Lactobacillus* + cell wall treatments compared to the *Lactobacillus* + inulin, inulin and cell wall treatments. This result did not mean what we found in growth effects.

In the present study, the addition of synbiotics supplements (combination of *Lactobacillus acidophilus* + inulin and *L. acidophilus* + cell wall of *Sacharomyces cerevisiae*) and the cell wall prebiotic in the diets of pike silverside *C. estor*, showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in growth improvement in terms of final body length and weight (FBL, FBW), weight gain (WG), per cent body weight gain (WGR, %), specific growth rate (SGR), condition factor (CF) and feed efficiency (FE). In addition, a significant reduction in feed conversion ratio (FCR) was found in both synbiotics and prebiotic cell wall treatments when compared to the control and prebiotic inulin diets (**Table 2**).

Among the treatments analyzed, synbiotics showed the best effects ( $p < 0.05$ ) compared to control and prebiotic treatments, followed by cell wall prebiotic which was higher compared to control and inulin prebiotic treatments (**Table 2**). This result has been seen in fish such as rainbow trout (Rodriguez-Estrada et al., 2009), cobia (Geng et al., 2011), Japanese flounder (Hasan et al., 2018) and striped catfish (Sutriana et al., 2021). However, there are studies where prebiotics and synbiotics have been applied with statistically similar results between them, and higher results with respect to the control diet (Ye et al., 2011; Singh et al., 2019). Regarding the modulation of the intestinal microbiota of juvenile *Chirostoma estor* by the application of prebiotic and synbiotic supplements, our results show significant changes in the Shannon diversity index and beta diversity analysis. Shannon index showed significantly lower values in synbiotic *Lactobacillus* + inulin (L+I) compared to the cell wall (W) treatment. While in beta diversity, ANOSIM showed no differences between groups and PERMANOVA analysis showed differences in synbiotic *Lactobacillus* + inulin (L+I) compared to the inulin (I) and cell wall (W) treatments. Cerezuela et al. (2013) in fish *Sparus aurata* found that the synbiotic *Bacillus subtilis*+inulin reduced richness (Shannon index) compared to control and inulin treatments added separately. While Kühlwein et al. (2013) by adding  $\beta$ -glucan to the diet of *Cyprinus carpio*, gut microbiota was significantly reduced. Different studies emphasize that lactic acid bacteria (LAB) such as *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* and *Weissella* are present in the gut of freshwater and marine fish (Muñoz-Atienza et al., 2013; Merrifield et al., 2014; Alonso et al., 2018; Ringø et al., 2018). The presence and abundance of these bacteria is influenced by different factors such as season (Hagi et al., 2004), stress (Uren Webster et al., 2020), salinity (Ringø and Strøm, 1994; Lin et al., 2020), and additives to the balanced diet (Giannenas et al., 2012; Gajardo et al., 2017; Terova et al., 2019). Furthermore, different works in the last decade have defined that diets with prebiotic, probiotic and synbiotic supplements are efficient modulators of LAB in the fish intestine (Reza et al 2009; Mouriño et al., 2012; Akrami et al., 2013; Cerezuela et al., 2013; Geraylou et al., 2012; Hoseinifar et al., 2013; Hoseinifar et al., 2015; Momeni-Moghaddam et al., 2015; Standen et al., 2015; Falcinelli et al., 2016; Akter et al., 2019; Tan et al., 2019). In our results, when we differentially analyzed the presence of bacteria modulated by the application of prebiotics and synbiotics in *C. estor*, we found that synbiotics significantly increased the abundance of *Lactobacillus* and other LAB such as

*Lactococcus*, *Enterococcus* and *Weissella*. In addition, the prebiotic inulin increased the presence of the lactic acid bacteria *Enterococcus*.

LAB found in *C. estor* can be considered beneficial, as they have functions like reducing the pH of the gut as a product of the synthesis of acetic acid, lactic acid, and propionic acid, thereby controlling the growth of pathogenic bacteria (Mussatto and Mancilha, 2007; Yousefian and Amiri, 2009; Ringø et al., 2018; Hoseinifar et al., 2020). It has been shown that *Lactobacillus* has the ability to carry out synthesis of amino acids such as isoleucine, leucine, lysine and valine (Dai et al., 2011; Hao et al., 2011; Neis et al., 2015), metabolites that when administered as part of the fish diet, increase growth, feed efficiency and muscle protein (Deyab and El-Saidy, 2002; Ahmed and Khan, 2006; Zhang et al., 2008; Zhao et al., 2012; Dong et al., 2013; Zehra and Khan, 2013; Gan et al., 2014; Wang et al., 2017; Huang et al., 2018). While in other studies *Enterococcus*, *Lactobacillus*, and *Lactococcus* have been found to synthesize B-complex vitamins (Rossi et al., 2011; Li et al., 2017; Yoshii et al., 2019; Walhe et al., 2021), which are related to growth, development of fish embryos and larvae (Sarker et al., 2012; Volkoff and London, 2018). *Weissella* has been generally known to be pathogenic in fish (Liu et al., 2009; Figueiredo et al., 2012; Welch and Good, 2013; Costa et al., 2015). However, it has been studied as a potential probiotic for producing bacteriocins (Masuda et al., 2011; Goh and Philip, 2015; Li et al., 2017). Also, it has been isolated and applied as a potential probiotic in fish with positive effects focused on growth improvement (Kahyani et al., 2021; Yeganeh-Rastekenari et al., 2021). Given this, *Weissella* found in *C. estor* modulated by the addition of synbiotics could have some positive influence on this organism.

Also, in our results synbiotics and inulin prebiotic treatments significantly increased *Achromobacter* genus compared to the control treatment. In another study, Xia et al. (2018) by adding *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactococcus lactis* to the diet of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*, noted significant increase of *Achromobacter* and indicated that these bacteria have cellulolytic and pectolytic activity.

Despite the changes in bacterial abundance due to the application of prebiotics and synbiotics, we found a core microbiota present in all treatments, which is represented by nine genera: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* and *Thermogemmatisspora*. These genera (except



*Spiroplasma* and *Thermogemmatispora*) have also been found as part of the core microbiota in both freshwater fish species (Roeselers et al., 2011; do Vale-Pereira et al., 2017; Tan et al., 2018; Rimoldi et al., 2019; Feng et al., 2021; Park and Kim, 2021) and marine fish (Gajardo et al., 2016; Jiang et al., 2018; Larios-Soriano et al., 2018; Nikouli et al., 2018; Jiang et al., 2019; Piazzon et al., 2019; Wu et al., 2021). These bacterial genera persist in these fish despite hosts possessing different dietary and environmental conditions of development, which may imply an ecological-functional relevance in the organism.

Multiple studies have shown that some bacteria found in *Chirostoma estor* core microbiota have several important functions. *Bacillus* and *Lactobacillus* have been isolated and applied as probiotics in fish with positive effects on growth and immune system improvement (Giri et al., 2014; Mohammadian et al., 2017; Dias et al., 2018; Hasan et al., 2018; Lee et al., 2018; Cao et al., 2019; Jami et al., 2019; Mukherjee et al., 2019; Kuebutornye et al., 2020; El-Saadony et al., 2021). Lu et al. (2011) found that *Citrobacter freundii* isolated from the gut of grass carp showed pathogenicity. However, Gurdiola-Alvarez et al. (2016) applied *Citrobacter* sp. as a probiotic against *Aeromonas salmonicida* in cyprinid *Puntius conchoni* achieving 100% of survival. In addition, it was seen that this bacterium has the ability to degrade cellulose (Wu et al., 2012; Liu et al., 2016) and synthesize methionine (Manukhov et al., 2006), this essential amino acid that has been used as a supplement for growth enhancement in fish (Mir et al., 2017; Guo et al., 2020). *Cutibacterium* also known as *Propionibacterium* produces vitamin B12, short-chain fatty acids and bacteriocin (Piao et al., 2004; Piwowarek et al., 2018). This bacteria has been found as part of the core microbiota in both freshwater (do Vale-Pereira et al., 2017; Park and Kim, 2021) and marine fish (Jiang et al 2018; Jiang et al 2019; Piazzon et al., 2019; Meron et al., 2020). *Pseudomonas* is considered an opportunistic pathogen of fish (Austin and Austin, 2016; Oh et al., 2019; Duman et al., 2021), although it has also been isolated from these organisms and applied as a probiotic enhancing growth and survival against pathogenic bacteria (Gram et al., 2001; Abd El-Rhman et al., 2009; Qi et al., 2020). *Stenotrophomonas* has been considered an opportunistic pathogen of marine fish *Seriola quinqueradiata* (Furushita et al., 2005) and freshwater catfish *Ictalurus punctatus* and *Clarias gariepinus* (Geng et al., 2010; Abraham et al., 2016). Also, this genus has been found as part of the core microbiota of marine fish (Gajardo et al., 2016; Larios Soriano et al., 2018; Wu et al., 2021). *Streptococcus* synthesizes amino acids and short-chain fatty acids (Dai et al., 2011;

Koh et al., 2016; Ozcelik et al., 2016; Cooper-Bribiesca et al., 2018). In fish, this genus has been found as a pathogen of aquatic mammals and fish (Delannoy et al., 2013; Torres-Corral et al., 2019; Yi et al., 2019), although it has also been applied as a growth-enhancing probiotic in fish (Lara-Flores et al., 2003; Ayyat et al., 2014). *Spiroplasma* is considered commensal in most insects, arachnids, crustaceans and plants (Cisak et al., 2015). However, it has been found as a pathogen in some crustaceans (Nunan et al., 2005; Ding et al., 2014). Also, recently *Spiroplasma* has been defined as a symbiont of hadal zone sea cucumber (He et al., 2017) and *Drosophila* flies (Gerth et al., 2021). In fish, Lin et al. (2018) indicated that *Spiroplasma* added to the diet of eel *Anguilla marmorata* reduces growth, while Ruzauskas et al. (2021) mention that *Spiroplasma* predominates in *Cyprinus carpio* from ponds, relating this bacterium to insect consumption by these fish. We know that *C. estor* consumes insects if they are close to their environment (Martínez-Palacios et al., 2019), so this fish could be acquiring these bacteria from its feeding habit, or there could be some symbiotic association. However, further studies such as transcriptomics and metabolomics are needed to confirm this association, or to determine that it is only present by insect consumption.

*Thermogemmatispora* has been found in abundance in geothermal sources (Yabe et al., 2011; King and King, 2014) and soil (Khodadad et al., 2020). There is no evidence of the presence of this bacterium in the gut of other fish, although pike silverside fish *Chirostoma estor* may have acquired it from the well water taken for the natural environment, which comes from a 170 meter deep.

We defined the relationship between the more abundant bacteria and growth of *C. estor* and noted that genus *Lactobacillus* was positively associated with growth parameters (**Fig. 3**). However, we do not know exactly the causal relationship between *Lactobacillus* and growth. Therefore, it is necessary to perform further studies and analyses of gene expression of bacteria and fish, metabolites that bacteria can produce and how they are related to fish growth, to finally define microbiota-growth relationship in *C. estor*.

The predicted metabolic pathways of intestinal microbiota by PICRUSt2, provides data for supporting the functions of the microbiota (Douglas et al., 2019). It was possible to predict the over-expression of genes associated with amino acid, carbohydrate, energy, nucleotide, cofactors and vitamins metabolic pathways, which might reflect the microbiota importance for

*C. estor* as previous studies have established the functional prediction in other species where microbiota were analyzed in fish (Li et al., 2017; Guangxin et al., 2022). However, further in-depth functional studies as metatranscriptomics and metabolomics would be needed to corroborate microbiota functionality in this species.

## **5. Conclusion**

In conclusion, the effects of prebiotics and synbiotics on moisture, ash, lipid and protein percentages are variable, so it is necessary to test more combinations to determine the effects more closely. The inclusion of synbiotics and prebiotic cell wall are a potential alternative for fish *C. estor* as they present the best results in terms of growth enhancement. Also, further studies are needed to evaluate dose and time responses of this dietary supplement for the culture of this species. The considerable increase of lactic acid bacteria in the synbiotic treatments reaffirms the influence of these supplements on the modulation of the intestinal microbiota. According to the core microbiota found in *C. estor* juveniles, these bacteria could have probiotic potential for further isolation, identification and use in improving growth and immune response in this endemic fish aquaculture. The relationship between *Lactobacillus* and growth parameters reaffirms the importance of this microorganism on fish culture, although further studies such as transcriptomics and metabolomics are required to confirm this relationship.

## **Funding**

This study was funded by Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (project no. 315841 and no. 315209) and Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH.

## **Sequence data**

The nucleotide sequence data reported are available in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) databases under the BioProject ID: PRJNA796804 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA796804/>).

## **Ethical statement**

All specimens were treated in accordance with EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and the guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (2007/526/EC).

## Declaration of Competing Interest

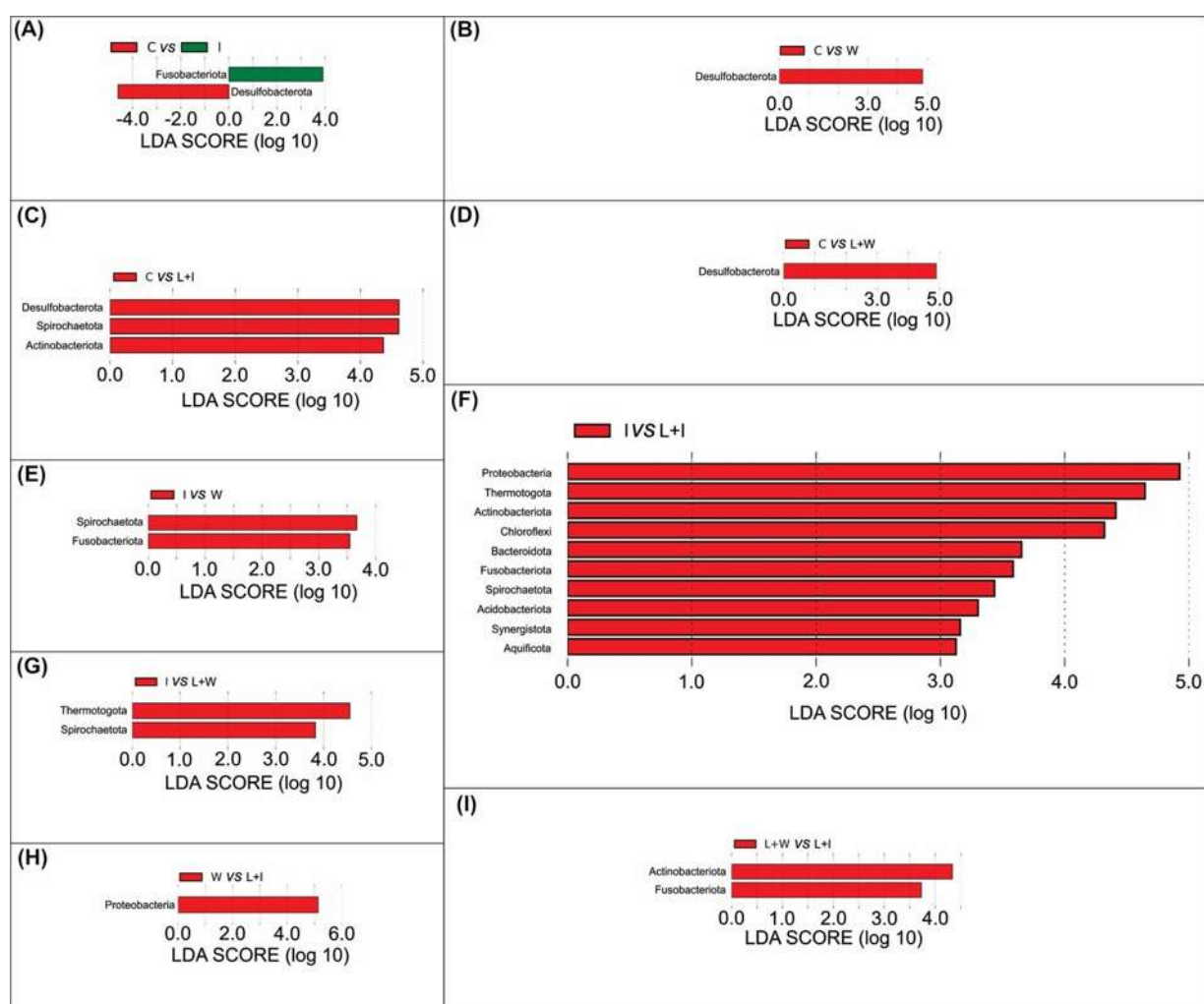
The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgments

The authors thank Guadalupe Pámanes Morales, MSc Sibila Concha Santos and Jesús López García for their invaluable technical assistance in the LANMDA laboratory, and biologist Iván Martínez and agricultural engineer Arturo Gómez for their invaluable help in the sampling.

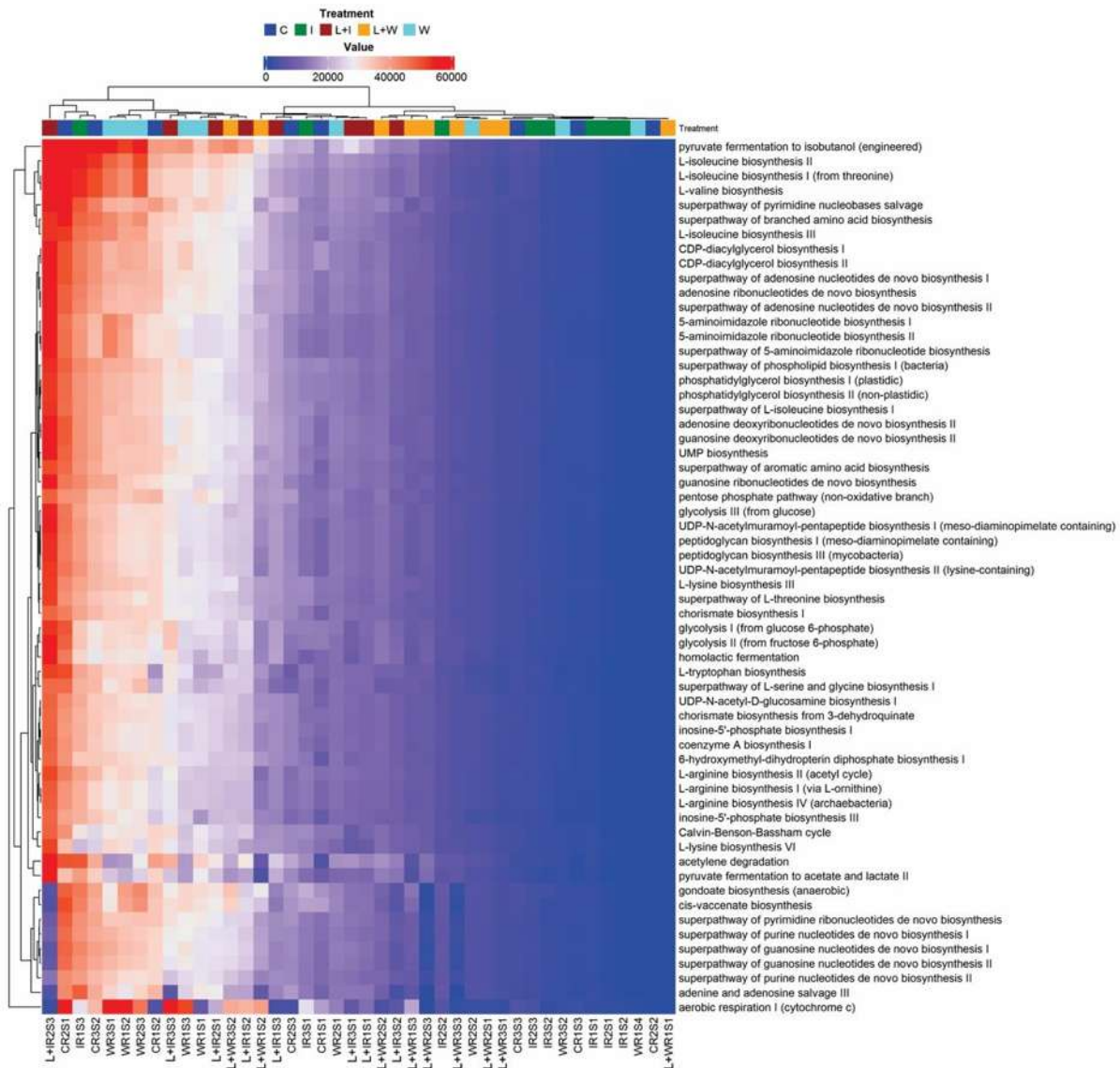
## Supplementary data

## Supplementary Figures



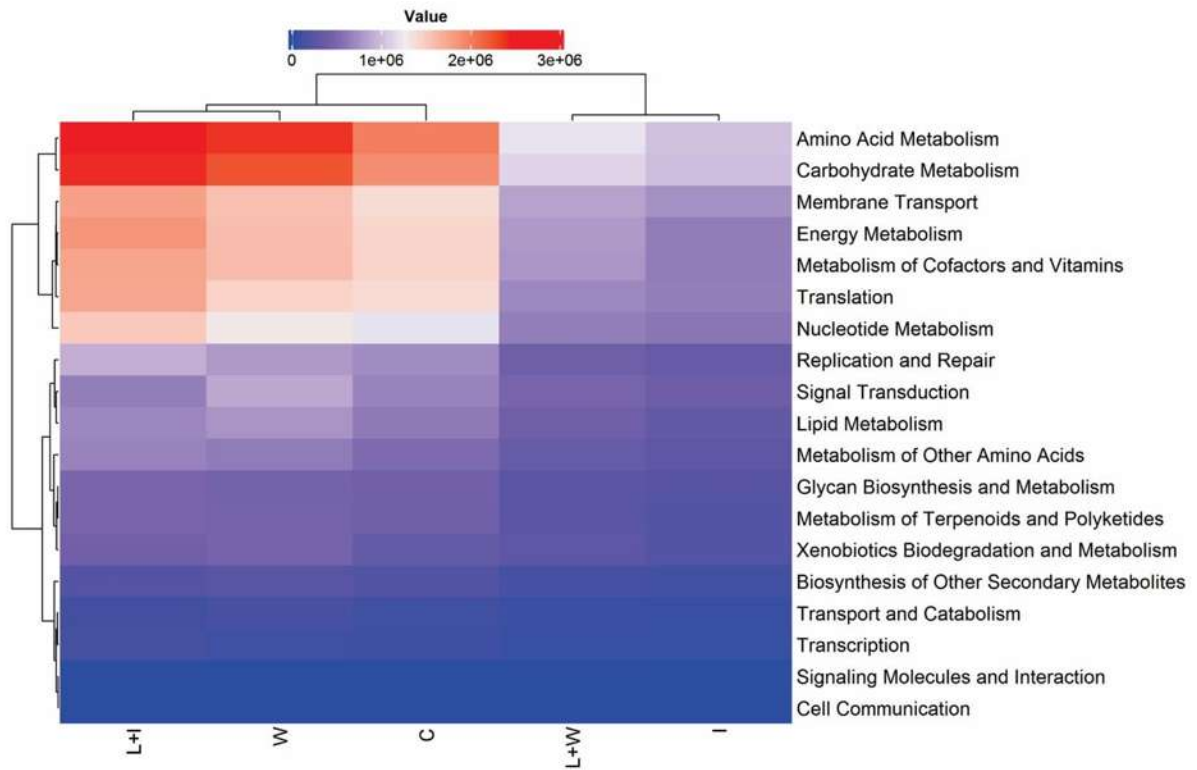
**Supplementary Fig. 1.** Comparison of LDA effect size of the significantly differentiating microbial Phylum deduced using LEfSe analysis among all control, prebiotics and synbiotics treatments (C, Control; I, Inulin; W, Cell wall; L+I, *Lactobacillus acidophilus* + Inulin; L+W, *L. acidophilus* + Cell wall). A). Differences in abundance of treatments C versus I; B).

Differences in abundance of treatments C versus W; C). Differences in abundance of treatments C versus L+I; D). Differences in abundance of treatments C versus L+W; E). Differences in abundance of treatments I versus W; F). Differences in abundance of treatments I versus L+I; G). Differences in abundance of treatments I versus L+W; H). Differences in abundance of treatments W versus L+I; I). Differences in abundance of treatments L+I versus L+W. Differences in abundance Differentiating feature analysis was carried out with Kruskal-Wallis test raw p-value cutoff = 0.05.

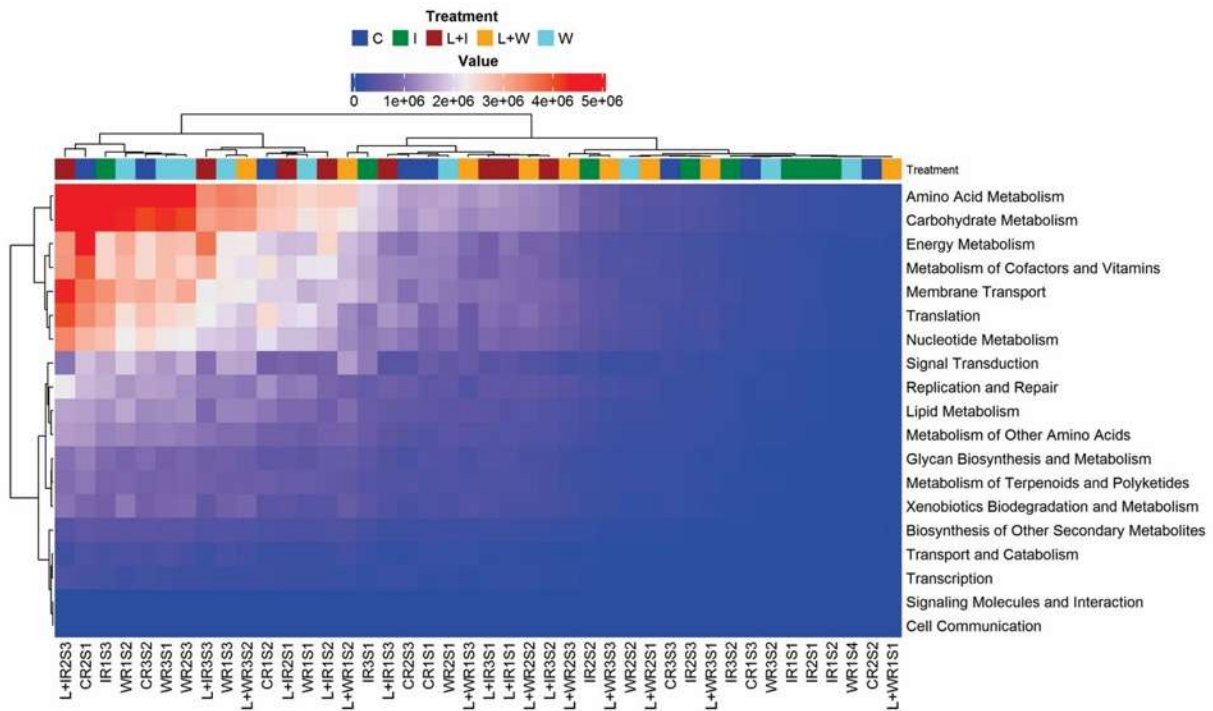


**Supplementary Fig. 2.** Heatmap of the 60 most abundant functional pathways inferred by PICRUSt2 in 5 all treatments of control, prebiotics and synbiotics. Control (C), Inulin (I), Cell wall (W), *Lactobacillus acidophilus* + Inulin (L+I), *L. acidophilus* + Cell wall (L+W). Red color represents higher value and blue color lower value. The top color bars indicate the

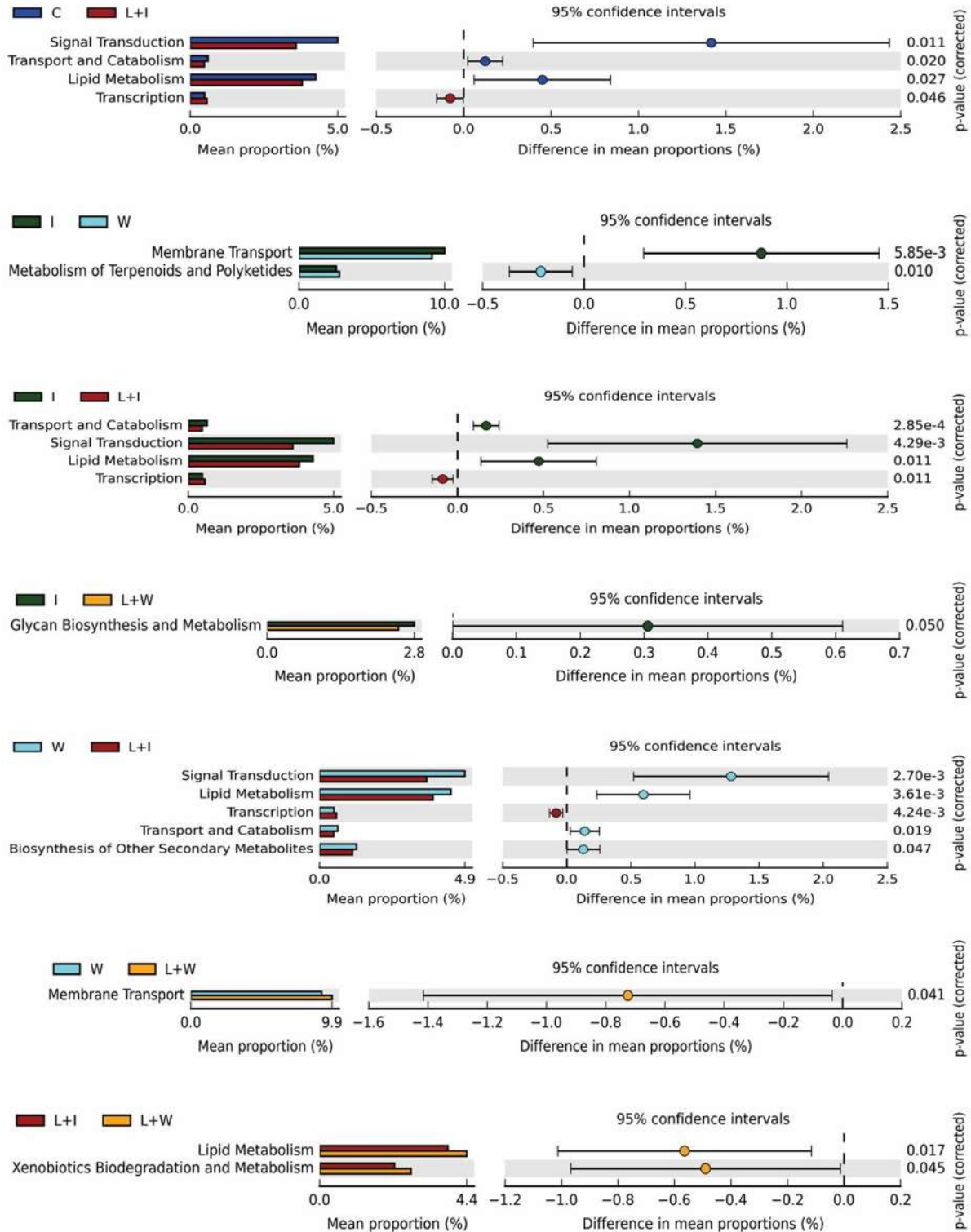
treatment groups. Blue bars C, Control; green bars I, Inulin; cyan bars W, Cell wall; brown bars L+I, *Lactobacillus acidophilus* + Inulin; orange bars L+W, *L. acidophilus* + Cell wall.



**Supplementary Fig. 3.** Heatmap and dendrogram of the average KOs pathways in all 5 treatments of control, prebiotics and synbiotics. Control (C), Inulin (I), Cell wall (W), *Lactobacillus acidophilus* + Inulin (L+I), *L. acidophilus* + Cell wall (L+W). Red color represents higher value and blue color lower value.



**Supplementary Fig. 4.** Heatmap and dendrogram of the all samples KOs pathways in all 5 treatments of control, prebiotics and synbiotics. Red color represents higher value and blue color lower value. The top color bars indicate the treatment groups. Blue bars C, Control; green bars I, Inulin; cyan bars W, Cell wall; brown bars L+I, *Lactobacillus acidophilus* + Inulin; orange bars L+W, *L. acidophilus* + Cell wall.



**Supplementary Fig. 5.** Differences (STAMP analysis) between the 5 treatments and their inferred PICRUSt2 KOs pathways edited in MEGAN5. Extended error bar plot identifying significant differences between mean proportions of KOs pathways of PICRUSt2 edited in MEGAN5 in pairwise groups of treatments of *Chirostoma estor*. Corrected P values are shown



at right. The legend groups are shown: C, Control; I, Inulin; W, Cell wall; L+I, *Lactobacillus acidophilus* + Inulin; L+W, *L. acidophilus* + Cell wall.

## Supplementary Tables

### Supplementary Table 1.

Total mean (%) relative abundance (first column)  $\pm$  SE, and mean relative abundance  $\pm$  SE of the 9 most prevalent Phyla and 2 Class of Phylum Proteobacteria found in gut samples of pike silverside seed with prebiotics and synbiotics. **Legends:** Control, C; Inulin, I; Cell wall, W; *Lactobacillus acidophilus* + inulin, L+I; *L. acidophilus* + cell wall, L+W. Different letters per row indicate statistical significance between treatments abundances ( $p < 0.05$ ).

Phylum	Total abundance (N=42)	Treatment				
		C (N=8)	I (N=8)	W (N=9)	L+I (N=8)	L+W (N=9)
Firmicutes	60.99 $\pm$ 4.68	50.66 $\pm$ 13.25 <b>a</b>	57.47 $\pm$ 7.87 <b>a</b>	57.78 $\pm$ 9.42 <b>a</b>	76.16 $\pm$ 8.44 <b>a</b>	63.04 $\pm$ 12.43 <b>a</b>
Gammaproteobacteria	12.53 $\pm$ 2.63	11.67 $\pm$ 4.45 <b>ab</b>	16.29 $\pm$ 7.07 <b>a</b>	11.17 $\pm$ 3.75 <b>a</b>	2.54 $\pm$ 1.03 <b>b</b>	20.19 $\pm$ 8.69 <b>a</b>
Thermotogota	5.31 $\pm$ 1.76	11.56 $\pm$ 6.75 <b>ab</b>	8.42 $\pm$ 3.53 <b>a</b>	5.08 $\pm$ 4.24 <b>ab</b>	0.36 $\pm$ 0.23 <b>b</b>	1.61 $\pm$ 0.96 <b>b</b>
Actinobacteriota	5.03 $\pm$ 1.37	4.48 $\pm$ 1.71 <b>a</b>	5.88 $\pm$ 1.33 <b>a</b>	9.85 $\pm$ 5.58 <b>a</b>	0.44 $\pm$ 0.19 <b>b</b>	4.03 $\pm$ 2.20 <b>a</b>
Cyanobacteria	4.97 $\pm$ 2.04	3.93 $\pm$ 3.29 <b>a</b>	0.34 $\pm$ 0.09 <b>a</b>	2.25 $\pm$ 1.74 <b>a</b>	18.65 $\pm$ 8.86 <b>a</b>	0.56 $\pm$ 0.21 <b>a</b>
Alphaproteobacteria	4.19 $\pm$ 0.91	1.67 $\pm$ 0.70 <b>b</b>	4.16 $\pm$ 1.02 <b>a</b>	6.00 $\pm$ 1.91 <b>ab</b>	1.00 $\pm$ 0.37 <b>b</b>	7.46 $\pm$ 3.39 <b>ab</b>
Chloroflexi	3.58 $\pm$ 1.13	7.28 $\pm$ 4.22 <b>a</b>	3.91 $\pm$ 1.76 <b>a</b>	4.66 $\pm$ 3.12 <b>ab</b>	0.34 $\pm$ 0.14 <b>b</b>	1.83 $\pm$ 1.12 <b>ab</b>
Desulfobacterota	1.47 $\pm$ 0.98	7.23 $\pm$ 4.88 <b>a</b>	0.30 $\pm$ 0.18 <b>b</b>	0.11 $\pm$ 0.08 <b>b</b>	0.06 $\pm$ 0.02 <b>b</b>	0.01 $\pm$ 0.01 <b>b</b>
Bacteroidota	0.59 $\pm$ 0.11	0.85 $\pm$ 0.29 <b>ab</b>	1.02 $\pm$ 0.34 <b>a</b>	0.68 $\pm$ 0.20 <b>ab</b>	0.17 $\pm$ 0.14 <b>b</b>	0.25 $\pm$ 0.09 <b>b</b>
Fusobacteriota	0.41 $\pm$ 0.11	0.17 $\pm$ 0.08 <b>bc</b>	0.81 $\pm$ 0.25 <b>a</b>	0.55 $\pm$ 0.39 <b>bc</b>	0.05 $\pm$ 0.03 <b>c</b>	0.46 $\pm$ 0.17 <b>ab</b>
Aquificota	0.22 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.11 <b>ab</b>	0.14 $\pm$ 0.05 <b>ab</b>	0.55 $\pm$ 0.46 <b>a</b>	0.02 $\pm$ 0.01 <b>b</b>	0.18 $\pm$ 0.11 <b>ab</b>

### Supplementary Table 2.

Mean  $\pm$  SD of alpha diversity (richness Chao1 and Shannon diversity) of data of gut microbiota between treatments (Control, C; Inulin, I; Cell wall, W; *Lactobacillus* + inulin, L+I; *Lactobacillus* + cell wall, L+W). Means in the same column with different letters indicate statistical significance between treatments ( $p < 0.05$ ).

Treatment	Alpha diversity index	
	Chao1	Shannon
C	1619.95 $\pm$ 854.29 <b>a</b>	2.80 $\pm$ 0.40 <b>ab</b>
I	2270.55 $\pm$ 708.75 <b>a</b>	3.18 $\pm$ 0.53 <b>ab</b>
W	2227.30 $\pm$ 1580.91 <b>a</b>	3.38 $\pm$ 0.47 <b>a</b>

**L+I**      1785.17 ± 784.33 **a**    2.59 ± 0.49 **b**

**L+W**      2545.80 ± 1153.38 **a**    3.16 ± 0.43 **ab**

---

**Supplementary Table 3.**

Analysis of similarity (ANOSIM) and Permutational multivariate analysis of variance (Adonis) of data of intestinal microbiota between control, prebiotics and synbiotics treatments.

---

<b>Statistics</b>	<b>Bray-Curtis</b>		
ANOSIM			
Permutation N	999		
R	0.05908		
<i>p</i> (same)	0.071		
Pairwise comparisons (adonis)	<i>p</i> value	R <sup>2</sup>	F value
C vs I	0.371	0.0683	1.0260
C vs W	0.447	0.0546	0.8661
C vs L+I	0.237	0.0822	1.2534
C vs L+W	0.228	0.0776	1.2613
I vs W	0.102	0.1087	1.8292

I vs L+I	<b>0.015</b>	0.1655	2.7770
I vs L+W	0.167	0.0932	1.5410
W vs L+I	<b>0.040</b>	0.1314	2.2686
W vs L+W	0.100	0.1051	1.8799
L+I vs L+W	0.094	0.1034	1.7299

---

C, Control; I, Inulin; W, Cell wall; L+I, *Lactobacillus acidophilus* + Inulin; L+W, *L. acidophilus* + Cell wall.

## References

- Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E, Shalaby, A.M.E., 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 27, 175–180. doi:10.1016/j.fsi.2009.03.020.
- Abraham, T.J., Paul, P., Adikesavalu, H., Patra, A., Banerjee, S., 2016. *Stenotrophomonas maltophilia* as an Opportunistic Pathogen in Cultured African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Aquaculture 450, 168–172. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.07.015
- Abu-Elala, N.M., Younis, N.A., AbuBakr, H.O., Ragaa, N.M., Borges, L.L., Bonato, M.A., 2018. Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. Egypt. J. Aquat. Res. doi:10.1016/j.ejar.2018.11.001
- Ahmed, I., Khan, M.A., 2006. Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Br. J. Nutr. 96, 450-460. DOI: 10.1079/BJN20061845
- Akrami, R., Iri, Y., Khoshbavar Rostami, H., Razeghi Mansour, M., 2013. Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. Fish Shellfish Immunol. 35(4), 1235–1239. doi:10.1016/j.fsi.2013.07.039
- Akter, M.N., Hashim, R., Sutriana, A., Siti Azizah, M.N., Asaduzzaman, M., 2019. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performances, digestive enzyme

activities and gut histomorphology of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878) juveniles. *Aquac. Res.* doi:10.1111/are.1393

Alonso, S., Castro, M.C., Berdasco, M., de la Banda, I.G., Moreno-Ventas, X., de Rojas, A.H., 2018. Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* doi:10.1007/s12602-018-9439-2

Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A., Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.* 25(1–2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013>

Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J., Huang, B., Li, H., 2020. The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions. : a review. *Aquac. Int.* doi:10.1007/s10499-020-00509-0

AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed. Washington DC.

Austin, B., Austin, D.A., 2016. Pseudomonads, in: Austin, B., Austin, D.A. (Eds.), *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, Springer International Publishing, Chichester, pp. 475-498.

Ayyat, M.S., Labib, H.M., Mahmoud, H.K., 2014. A Probiotic Cocktail as a Growth Promoter in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Aquac.* 26(3), 208–215. doi:10.1080/10454438.2014.934164

Baldo, L., Riera, J.L., Tooming-Klunderud, A., Albà, M.M., Salzburger, W., 2015. Gut Microbiota Dynamics during Dietary Shift in Eastern African Cichlid Fishes. *PLOS ONE* 10(5), 1-23 doi:10.1371/journal.pone.0127462

Bray, J.R., Curtis, J.T., 1957. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27(4), 325-349.

Cao, H., Yu, R., Zhang, Y., Hu, B., Jian, S., Wen, C., Kajbaf, K., Kumar, V., Yang, G., 2019. Effects of dietary supplementation with  $\beta$ -glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze). *Aquaculture* 508, 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.064>

Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M.Á., Esteban, M.Á., 2013. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish Shellfish Immunol.* 34(5), 1063–1070. doi:10.1016/j.fsi.2013.01.015

Cerezuela, R., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2011. Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review. *J. Aquac. Res. Development.* S1:008. doi:10.4172/2155-9546.S1-008

- Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Zając, V., Sawczyn, A., Sroka, J., Dutkiewicz, J., 2015. *Spiroplasma* – an emerging arthropod-borne pathogen? *Ann. Agric. Environ. Med.* 22(4), 589–593. doi: 10.5604/12321966.1185758
- Conway, J.R., Lex, A., Gehlenborg, N., 2017. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* 33(18), 2938-2940. doi: 10.1093/bioinformatics/btx364.
- Cooper-Bribiesca, B., Navarro-Ocaña, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar-Osorio, G., Rodríguez-Sanoja, R., Wachter, C., 2018. Lactic Acid Fermentation of Arabinoxylan From Nejayote by *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius* 25124 Isolated From Pozol. *Front. Microbiol.* 9, 3061. doi:10.3389/fmicb.2018.03061
- Costa, F., Leal, C., Schuenker, N., Leite, R., Figueiredo, H., 2015. Characterization of *Weissella ceti* infections in Brazilian rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farms and development of an oil-adjuvanted vaccine. *J. Fish Dis.* 38, 295–302. <https://doi.org/10.1111/jfd.12236>
- Dai, Z.-L., Wu, G., Zhu, W.-Y., 2011. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Front. Biosci.* 16(1), 1768. doi:10.2741/3820
- Dawood, M.A.O., Eweedah, N.M., Moustafa, E.M., Shahin, M.G., 2019. Synbiotic Effects of *Aspergillus oryzae* and  $\beta$ -Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* doi:10.1007/s12602-018-9513-9
- Delannoy, C.M., Crumlish, M., Fontaine, M.C., Pollock, J., Foster, G., Dagleish, M.P., Turnbull, J.F., Zadoks, R.N., 2013. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC Microbiol.* 13(1), 41. doi:10.1186/1471-2180-13-41
- Dias, J.A.R., Abe, H.A., Sousa, N.C., Couto, M.V.S., Cordeiro, C.A.M., Meneses, J.O., Cunha, F.S., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., Barbas, L.A.L., Carneiro, P.C.F., Maria, A.N., Fujimoto, R.Y., 2018. Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquac. Res.* 49, 3063-3070. DOI: 10.1111/are.13767
- Ding, Z.F., Xia, S.Y., Xue, H., Tang, J.Q., Ren, Q., Gu, W., Meng, Q.G., Wang, W., 2014. Direct visualization of the novel pathogen, *Spiroplasma eriocheiris*, in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) using fluorescence *in situ* hybridization. *J. Fish Dis.* 38(9), 787–794. doi:10.1111/jfd.12287
- Ding, Z.F., Xia, S.Y., Xue, H., Tang, J.Q., Ren, Q., Gu, W., Meng, Q.G., Wang, W., 2014. Direct visualization of the novel pathogen, *Spiroplasma eriocheiris*, in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) using fluorescence *in situ* hybridization. *J. Fish Dis.* 38(9), 787–794. doi:10.1111/jfd.12287
- do Vale-Pereira, G., da Cunha, D.G., Pedreira-Mourino, J.L., Rodiles, A., Jaramillo-Torres, A., Merrifieds, D.L., 2017. Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and

isolation of potential probiotic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 123, 1298-1311.  
doi:10.1111/jam.13572.

Dong, M., Feng, L., Kuang, S.-Y., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Jiang, W.-D., Li, S.-H., Tang, L., Zhou, X.-Q., 2013. Growth, body composition, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of dietary valine. *Aquac. Nutr.* 19(1), 1–14. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00926.x

Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I., 2019. PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *bioRxiv* 672295. doi: <https://doi.org/10.1101/672295>.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid dna isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19(1), 11-15.

Duman, M., Mulet, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., Ozdemir, B., Ajmi, N., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2021. The diversity of *Pseudomonas* species isolated from fish farms in Turkey. *Aquaculture* 535, 736369. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.736369

El-Saadony, M.T., Alagawany, M., Patra, A.K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M.A O., Dhama, K., Abdel-Latif, H.M.R., 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish Shellfish Immunol.* 117, 36–52. doi:10.1016/j.fsi.2021.07.007

Falcinelli, S., Rodiles, A., Unniappan, S., Picchiatti, S., Gioacchini, G., Merrifield, D.L., Carnevali, O., 2016. Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model. *Sci. Rep.* 6(1). doi:10.1038/srep18061

FAO, 2018. The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050. Summary versión, Rome. ISBN 978-92-5-130989-6

FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals, Rome. ISBN 978-92-5-130562-1

FAO, WHO, 2006. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO Food and Nutrition Paper No. 85, FAO, Rome, Italy. ISBN 92-5-105513-0.

Feng, C., Sarigaiqiqige, Liu, W., Chen, H., Dong, W., Yang, J., 2021. Effect of dark environment on intestinal flora and expression of genes related to liver metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C: Toxicol. Pharmacol.* 249, 109100. doi:10.1016/j.cbpc.2021.109100

Figueiredo, H., Costa, F., Leal, C., Carvalho-Castro, G., Leite, R., 2012. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. *Vet. Microbiol.* 156, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.008>

Furushita, M., Okamoto, A., Maeda, T., Ohta, M., Shiba, T., 2005. Isolation of Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)

from a Marine Fish Farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9), 5598–5600.  
doi:10.1128/aem.71.9.5598-5600.2005

Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T.M., Merrifield, D.L., Tinsley, J., Bakke, A.M., Krogdahl, Å., 2017. Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02615-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02615-16>.

Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., Merrifield, D.L., Sørum, H., 2016. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. *Sci. Rep.* 6(1). doi:10.1038/srep30893

Gan, L., Jiang, W.-D., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Li, S.-H., Kuang, S.-Y., Feng, L., Zhou, X.-Q., 2014. Flesh Quality Loss in Response to Dietary Isoleucine Deficiency and Excess in Fish: A Link to Impaired Nrf2-Dependent Antioxidant Defense in Muscle. *PLoS ONE* 9(12), e115129. doi:10.1371/journal.pone.0115129

Ganguly, S., Paul, I., Mukhopadhyay, S.K., 2010. Application and Effectiveness of Immunostimulants, Probiotics, and Prebiotics in Aquaculture: A Review. *Isr. J. Aquac.* 62(3), 2010, 130-138.

Geng, X., Dong, X.-H., Tan, B.-P., Yang, Q.-H., Chi, S.-Y., Liu, H.-Y., & Liu, X.-Q., 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunol.* 31(3), 400–406. doi:10.1016/j.fsi.2011.06.006

Geng, Y., Wang, K., Chen, D., Huang, X., He, M., Yin, Z., 2010. *Stenotrophomonas maltophilia*, an Emerging Opportunist Pathogen for Cultured Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, in China. *Aquaculture* 308(3-4), 132–135. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.08.032

Geraylou, Z., Souffreau, C., Rurangwa, E., D'Hondt, S., Callewaert, L., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Buyse, J., Ollevier, F., 2012. Effects of arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) performance, immune responses and gastrointestinal microbial community. *Fish Shellfish Immunol.* 33(4), 718–724.  
doi:10.1016/j.fsi.2012.06.010

Gerth, M., Martinez-Montoya, H., Ramirez, P., Masson, F., Griffin, J.S., Aramayo, R., Siozios, S., Lemaitre, B., Mateos, M., Hurst, G.D.D., 2021. Rapid molecular evolution of *Spiroplasma* symbionts of *Drosophila*. *Microb. Genom.* 7, 000503. DOI 10.1099/mgen.0.000503

Giannenas, I., Triantafyllou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., Karagouni, E., 2012. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350-353, 26–32.  
doi:10.1016/j.aquaculture.2012.04.027

Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G., 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* doi:10.1038/nrgastro.2017.75

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* 125(6), 1401-1412. doi: 10.1093/jn/125.6.1401.

Giri, S.S., Sukumaran, V., Sen, S.S., Jena, P.K., 2014. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*. *Aquac. Nutr.* 20, 163-171.

Goh, H.F., Philip, K., 2015. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin. *PLoS One* 10, e0140434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140434>

Gram, L., Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J., Spanggaard, B., 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* 199(1-2), 1-11. doi:10.1016/s0044-8486(01)00565-8

Gu, Z., Eils, R., Schlesner, M., 2016. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32(18), 2847-2849. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313.

Guangxin, G., Li, K., Zhu, Q., Zhao, C., Li, C., He, Z., Hu, S., Ren, Y., 2022. Improvements of immune genes and intestinal microbiota composition of turbot (*Scophthalmus maximus*) with dietary oregano oil and probiotics. *Aquaculture* 547, 737442. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.737442

Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2017. Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev. Aquac.* 10:800-832. doi:10.1111/raq.12201

Guo, T.-Y., Zhao, W., He, J.-Y., Liao, S.-Y., Xie, J.-J., Xie, S.-W., Masagounder, K., Liu, Y.-J., Tian, L.-X., Niu, J., 2020. Dietary DL-Methionyl-DL-Methionine supplementation increased growth performance, antioxidant ability, the content of essential amino acids and improved the diversity of intestinal microbiota in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Br. J. Nutr.* 123: 72-83. doi:10.1017/S0007114519002289

Gupta, S., Fečkaninová, A., Lokesh, J., Koščová, J., Sørensen, M., Fernandes, J., Kiron, V., 2019. *Lactobacillus* Dominate in the Intestine of Atlantic Salmon Fed Dietary Probiotics. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.03247

Gurdiola-Alvarez, K.A., Monroy-Dosta, M.C., Rodríguez-Gutiérrez, M. Núñez-Cardona, M.T., 2016. Biological control of *Aeromonas salmonicida* in *Puntius conchonius* culture using probiotics under laboratory and fish farm conditions. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 4(4), 440-443.



Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., Hoshino, T., 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* 234(1-4), 335–346. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.01.018

Hao, P., Zheng, H., Yu, Y., Ding, G., Gu, W., Chen, S., Yu, Z., Ren, S., Oda, M., Konno, T., Wang, S., Li, X., Ji, Z.-S., Zhao, G., 2011. Complete Sequencing and Pan-Genomic Analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Reveal Its Genetic Basis for Industrial Yogurt Production. *PLoS ONE* 6(1), e15964. doi:10.1371/journal.pone.0015964

Hasan, M.T., Jang, W.J., Kim, H., Lee, B.-J., Kim, K.W., Hur, S.W., Lim, S.G., Bai, S.C., Kong, I.-S., 2018. Synergistic effects of dietary *Bacillus* sp. SJ-10 plus  $\beta$ -glucooligosaccharides as a synbiotic on growth performance, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 82, 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.002>

He, L.-S., Zhang, P.-W., Huang, J.-M., Zhu, F.-C., Danchin, A., Wang, Y., 2018. The enigmatic genome of an obligate ancient *Spiroplasma* symbiont in a hadal holothurian. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e01965-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01965-17>.

Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A., Sun, Y.-Z., 2015. Probiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 23(4), 315–328. doi:10.1080/23308249.2015.1052365

Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Khoshbavar Rostami, H., Esteban, M.Á., 2013. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish Shellfish Immunol.* 35(5), 1416–1420. doi:10.1016/j.fsi.2013.08.007

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Merrifield, D.L., 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture* 318(1-2), 90–94. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.043

Hoseinifar, S.H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., Carnevali, O., 2020. Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 1–20. doi:10.1080/23308249.2020.1795616

Huang, Z., Tan, X.-h., Zhou, C.-p., Yang, Y.-k., Qi, C.-l., Zhao, S.-y., Lin, H.-z., 2018. Effect of dietary valine levels on the growth performance, feed utilization and immune function of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquac. Nutr.* 24(1), 74–82. DOI: 10.1111/anu.12535

Huse, S.M., Dethlefsen, L., Huber, J.A., Welch, D.M., Relman, D.A., Sogin, M.L., 2008. Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. *PLoS Genet.* 4(11), 1-10 doi:10.1371/journal.pgen.1000255.

Huson, D.H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., Ruscheweyh, H.-J., Tappu, R., 2016. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Comput. Biol.* 12(6), 1-12  
DOI:10.1371/journal.pcbi.1004957.

Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25(11), 633-642.  
doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x

Jami, M.J., Kenari, A.A., Paknejad, H., Mohseni, M., 2019. Effects of dietary  $\beta$ -glucan, mannan oligosaccharide, *Lactobacillus plantarum* and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). *Fish Shellfish Immunol.* 91, 202-208.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.024>.

Jiang, Y., Liu, X., Xu, Y., Shi, B., Wang, B., 2019. Microbiota characteristics in *Sebastes schlegelii* intestine in early life stages. *J. Oceanol. Limnol.* doi:10.1007/s00343-019-9011-2

Jiang, Y., Liu, Z., Liu, X., Xu, Y., Shi, B., Wang, B., 2018. Structural characteristics and succession of intestinal microbiota for *Paralichthys olivaceus* during the early life stage. *Aquac. Res.* 50, 529-540. doi:10.1111/are.13924

Kahyani, F., Pirali-Kheirabadi, E., Shafiei, S., Shenavar Masouleh, A., 2021. Effect of dietary supplementation of potential probiotic *Weissella confusa* on innate immunity, immune-related genes expression, intestinal microbiota and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 27(5), 1411–1420. doi:10.1111/anu.13279

Khodadad, C.L.M., Hummerick, M.E., Spencer, L.E., Dixit, A.R., Richards, J.T., Romeyn, M.W., Smith, T.M., Wheeler, R.M., Massa, G.D., 2020. Microbiological and Nutritional Analysis of Lettuce Crops Grown on the International Space Station. *Front. Plant Sci.* 11. doi:10.3389/fpls.2020.00199

King, C.E., King, G.M., 2014. Description of *Thermogemmatispora carboxidivorans* sp. nov., a carbon-monoxide-oxidizing member of the class Ktedonobacteria isolated from a geothermally heated biofilm, and analysis of carbon monoxide oxidation by members of the class Ktedonobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1244–1251. doi: 10.1099/ijs.0.059675-0

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Bäckhed, F., 2016. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 165(6), 1332–1345. doi:10.1016/j.cell.2016.05.041

Kuebutornye, F.K.A., Abarike, E.D., Lu, Y., Hlordzi, V., Sakyi, M.E., Afriyie, G., Wang, Z., Li, Y., Xie, C.X., 2020. Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.* doi:10.1007/s10695-019-00754-y

Kühlwein, H., Emery, M.J., Rawling, M.D., Harper, G.M., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2013. Effects of a dietary  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial

communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Appl. Microbiol. 115(5), 1091–1106. doi:10.1111/jam.12313

Kumar, P., Jain, K.K., Sardar, P., Jayant, M., Tok, N.C., 2017. Effect of dietary synbiotic on growth performance, body composition, digestive enzyme activity and gut microbiota in *Cirrhinus mrigala* (Ham.) fingerlings. Aquac. Nutr. 24(3), 921–929. doi:10.1111/anu.12628

Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., López-Madrid, W., 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Aquaculture 216(1), 193–201.

Larios Soriano, E., Tovar Ramírez, D., Re Araujo, D., Gómez-Gil, B., Ibarra Castro, L., Galindo Sánchez, C., 2018. Effect of temperature and dietary lipid proportion on gut microbiota in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* juveniles. Aquaculture 497, 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.065>

Lee, S., Katya, K., Hamidoghli, A., Hong, J., Kim, D.-J., Bai S.C., 2018. Synergistic effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* WB60 and mannanoligosaccharide (MOS) on growth performance, immunity and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish Shellfish Immunol. 83, 283-291. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.031>

Li, P., Gu, Q., Wang, Y., Yu, Y., Yang, L., Chen, J.V., 2017. Novel vitamin B12-producing *Enterococcus* spp. and preliminary in vitro evaluation of probiotic potentials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101(15), 6155–6164. doi:10.1007/s00253-017-8373-7

Li, S.-W., Chen, Y.-S., Lee, Y.-S., Yang, C.-H., Sriannual, S., Wu, H.-C., Chang, C.-H., 2017. Comparative genomic analysis of bacteriocin-producing *Weissella cibaria* 110. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101(3), 1227–1237. doi:10.1007/s00253-016-8073-8

Li, T., Long, M., Li, H., Gatesoupe, F.-J., Zhang, X., Zhang, Q., Feng, D., Li, A., 2017. Multi-Omics Analysis Reveals a Correlation between the Host Phylogeny, Gut Microbiota and Metabolite Profiles in Cyprinid Fishes. Front. Microbiol. 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00454

Lin, G., Zheng, M., Li, S., Xie, J., Fang, W., Gao, D., Huang, J., Lu, J., 2020. Response of gut microbiota and immune function to hypoosmotic stress in the yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). Sci. Total Environ. 745, 140976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140976>

Lin, M., Zeng, C., Jia, X., Zhai, S., Li, Z., Ma, Y., 2018. The composition and structure of the intestinal microflora of *Anguilla marmorata* at different growth rates: a deep sequencing study. J. Appl. Microbiol. doi:10.1111/jam.14174

Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., Wang, W., 2016. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. Sci. Rep. 6(1). doi:10.1038/srep24340

- Liu, J.Y., Li, A.H., Ji, C., Yang, W.M., 2009. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Vet. Microbiol.* 136, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.027>
- Lü, A., Hu, X., Zheng, L., Zhu, A., Cao, C., Jiang, J., 2011. Isolation and characterization of *Citrobacter* spp. from the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture* 313(1–4), 156–160. DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.01.018
- Magoc, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27(21), 2957–2963 doi:10.1093/bioinformatics/btr507.
- Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R., Ollevier, F., 2005. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquac. Int.* 14(3), 219–229. doi:10.1007/s10499-005-9003-4
- Manukhov, I.V., Mamaeva, D.V., Morozova, E.A., Rastorguev, S.M., Faleev, N.G., Demidkina, T.V., Zavilgelsky, G.B., 2006. L-methionine  $\gamma$ -lyase from *Citrobacter freundii*: Cloning of the gene and kinetic parameters of the enzyme. *Biochem. (Mosc.)* 71(4), 361–369. doi:10.1134/s0006297906040031
- Martínez-Palacios, C.A., Aguilar-Valdez, M.C., Strüssmann, C.A., Ríos-Durán, M.G., Toledo-Cuevas, E.M., Navarrete-Ramírez, P., Fonseca-Madrugal, J., Martínez-Chávez, C.C., Ross, L.G., 2019. The orobranchial structures in four neotropical silversides (Teleostei: Atherinopsidae) related with feeding habits. *Zoomorphology* 138(1), 511–523. <https://doi.org/10.1007/s00435-019-00457-1>.
- Masuda, Y., Zendo, T., Sawa, N., Perez, R.H., Nakayama, J., Sonomoto, K., 2011. Characterization and identification of weissellicin Y and weissellicin M, novel bacteriocins produced by *Weissella hellenica* QU 13. *J. Appl. Microbiol.* 112(1), 99–108. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05180.x
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8, e61217 doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2014. Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Comput. Biol.* 10(4), 1–12 doi:10.1371/journal.pcbi.1003531.
- Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., Jafarpour, A., 2011. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96(3), 474–481. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01167.x
- Meron, D., Davidovich, N., Ofek-Lalzar, M., Berzak, R., Scheinin, A., Regev, Y., Diga, R., Tchernov, D., Morick, D., 2020. Specific pathogens and microbial abundance within liver and kidney tissues of wild marine fish from the Eastern Mediterranean Sea. *Microb. Biotechnol.* doi:10.1111/1751-7915.13537

Merrifield, D.L., Balcázar, J.L., Daniels, C., Zhou, Z., Carnevali, O., Sun, Y.-Z., Hoseinifar, S.H., Ringø, E., 2014. Indigenous Lactic Acid Bacteria in Fish and Crustaceans, in: Merrifield, D.L., Ringø, E. (Eds.), *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, pp. 128-168.

Mir, I.N., Sahu, N.P., Pal, A.K., Makesh, M., 2017. Synergistic effect of l-methionine and fucoidan rich extract in eliciting growth and non-specific immune response of *Labeo rohita* fingerlings against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 479, 396–403. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.06.001

Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M., and Gharibi, D., 2017. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on growth performance, gut microbial flora and digestive enzymes activities in *Tor grypus* (Karaman, 1971). *Iran. J. Fish. Sci.* 16, 296-317.

Momeni-Moghaddam, P., Keyvanshokoo, S., Ziaei-Nejad, S., Parviz Salati, A., Pasha-Zanoosi, H., 2015. Effects of mannan oligosaccharide supplementation on growth, some immune responses and gut lactic acid bacteria of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Vet. Res. Forum* 6 (3), 239-244.

Mouriño, J.L.P., Do Nascimento Vieira, F., Jatobá, A.B., Da Silva, B.C., Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L., 2011. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquac. Nutr.* 18(1), 73–80. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00879.x

Mukherjee, A., Chandra, G., Ghosh, K., 2019. Single or conjoint application of autochthonous *Bacillus* strains as potential probiotics: Effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture* 512, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734302>

Muñoz-Atienza, 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 Microbiol.* 13(1), 15. doi:10.1186/1471-2180-13-15

Mussatto, S.I., Mancilha, I.M., 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* 68(3), 587–597. doi:10.1016/j.carbpol.2006.12.011

Neis, E., Dejong, C., Rensen, S., 2015. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. *Nutrients* 7(4), 2930–2946. doi:10.3390/nu7042930

Nikouli, E., Meziti, A., Antonopoulou, E., Mente, E., Kormas, K., 2018. Gut Bacterial Communities in Geographically Distant Populations of Farmed Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microorganisms* 6(3), 92. doi:10.3390/microorganisms6030092

Nunan, L.M., Lightner, D.V., Oduori, M.A., Gasparich, G.E., 2005. *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. Int. J. Syst. Evol. 55(6), 2317–2322. doi:10.1099/ijvs.0.63555-0

Oh, W.T., Kim, J.H., Jun, J.W., Giri, S.S., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S.G., Kim, S.W., Han, S.J., Kwon, J., Park, S.C., 2019. Genetic Characterization and Pathological Analysis of a Novel Bacterial Pathogen, *Pseudomonas tructae*, in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Microorganisms 7(10), 432. doi:10.3390/microorganisms7100432

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2019. Package 'vegan' (Version 2.5-6). <https://github.com/vegandevs/vegan>

Ortiz, L.T., Rebolé, A., Velasco, S., Rodríguez, M.L., Treviño, J., Tejedor, J.L., Alzueta, C., 2012. Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac. Nutr. 19(4), 475–482. doi:10.1111/j.1365-2095.2012.00981.x

Özcelik, S., Kuley, E., Özogul, F., 2016. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. LWT 73, 536-542. doi:10.1016/j.lwt.2016.06.066

Özlüer Hunt, A., Çetinkaya M., Özkan Yılmaz F., Yıldırım M., Berköz M., Yalın S., 2019. Effect of Dietary Supplementation of Inulin on Growth Performance, Digestion Enzyme Activities and Antioxidant Status of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). TURJAF 7(9): 1344-1353. DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i9.1344-1353.2581>

Park, J., Kim, E.B., 2021. Insights into the Gut and Skin Microbiome of Freshwater Fish, Smelt (*Hypomesus nipponensis*). Curr. Microbiol. 78(5), 1798–1806. doi:10.1007/s00284-021-02440-w

Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. Bioinformatics 30(21), 3123-3124. doi:10.1093/bioinformatics/btu494.

Piao, Y., Yamashita, M., Kawaraichi, N., Asegawa, R., Ono, H., Murooka, Y., 2004. Production of vitamin B12 in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*. J. Biosci. Bioeng. 98(3), 167-173. doi:10.1016/s1389-1723(04)00261-0

Piazzon, M.C., Naya-Català, F., Simó-Mirabet, P., Picard-Sánchez, A., Roig, F.J., Caldich-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., 2019. Sex, Age, and Bacteria: How the Intestinal Microbiota Is Modulated in a Protandrous Hermaphrodite Fish. Front. Microbiol. 10, 2512. doi:10.3389/fmicb.2019.02512

Piccolo, G., Centoducati, G., Bovera, F., Marrone, R., Nizza, A., 2013. Effects of Mannan Oligosaccharide and Inulin on Sharpnose Seabream (*Diplodus puntazzo*) in the Context of Partial Fish Meal Substitution by Soybean Meal. Ital. J. Anim. Sci. 12(1), e22. doi:10.4081/ijas.2013.e22

Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Bzducha-Wróbel, A., Synowiec, A., 2018. Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* strain T82. *Antonie Leeuwenhoek* 111(6), 921-932. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0991-7>

Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Kieliszek, M., Ścibisz, I., 2017. *Propionibacterium* spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(2), 515–538. doi:10.1007/s00253-017-8616-7

Qi, X., Xue, M., Cui, H., Yang, K., Song, K., Zha, J., Wang, G., Ling, F., 2020. Antimicrobial activity of *Pseudomonas monteilii* JK-1 isolated from fish gut and its major metabolite, 1-hydroxyphenazine, against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 526, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735366>.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Oliver Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590-596. doi:10.1093/nar/gks1219.

R Core Team 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org/>

Reza, A., Abdolmajid, H., Abbas, M., Abdolmohammad, A.K., 2009. Effect of Dietary Prebiotic Inulin on Growth Performance, Intestinal Microflora, Body Composition and Hematological Parameters of Juvenile Beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *J. World Aquac. Soc.* 40(6), 771–779. doi:10.1111/j.1749-7345.2009.00297.x

Rimoldi, S., Gini, E., Iannini, F., Gasco, L., Terova, G., 2019. The effects of dietary insect meal from *Hermetia illucens* prepupae on autochthonous gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals* 9, 1–17. doi:10.3390/ani9040143.

Ringø, E., Hoseinifar, S.H., Ghosh, K., Doan, H.V., Beck, B.R., Song, S.K., 2018. Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01818

Ringø, E., Strøm, E., 1994. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquac. Res.* 25(6), 623–629. doi:10.1111/j.1365-2109.1994.tb00726.x

Rodríguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Sweetman, J., 2009. Effects of Single and Combined Supplementation of *Enterococcus faecalis*, Mannan Oligosaccharide and Polyhydroxybutyrate Acid on Growth Performance and Immune Response of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacult. Sci.* 57(4), 609-617.

Roeselers, G., Mittge, E.K., Stephens, W.Z., Parichy, D.M., Cavanaugh, C.M., Guillemin, K., Rawls, J.F., 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J* 5, 1595–1608. doi:10.1038/ismej.2011.38.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ 4,1-22 DOI 10.7717/peerj.2584.

Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S., 2011. Folate Production by Probiotic Bacteria. Nutrients 3(1), 118–134. doi:10.3390/nu3010118

Ruzauskas, M., Armalyte, J., Lastauskiene, E., Šiugždiniene, R., Klimiene, I., Mockeliūnas, R., Bartkiene, E., 2021. Microbial and Antimicrobial Resistance Profiles of Microbiota in Common Carps (*Cyprinus carpio*) from Aquacultured and Wild Fish Populations. Animals 11, 1-14 <https://doi.org/10.3390/ani11040929>.

Sarker, P.K., Yossa, R., Karanth, S., Ekker, M., Vandenberg, G.W., 2012. Influences of dietary biotin and avidin on growth, survival, deficiency syndrome and hepatic gene expression of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish Physiol. Biochem. 38(4), 1183–1193. doi:10.1007/s10695-012-9604-6

Schiavone, M., Déjean, S., Sieczkowski, N., Castex, M., Dague, E., François, J.M., 2017. Integration of Biochemical, Biophysical and Transcriptomics Data for Investigating the Structural and Nanomechanical Properties of the Yeast Cell Wall. Front. Microbiol. 8:1806. doi: 10.3389/fmicb.2017.01806

Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics 27(6), 863-864 doi:10.1093/bioinformatics/btr026.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 12, 1-18. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.

Singh, S.K., Tiwari, V.K., Chadha, N.K., Munilkumar, S., Prakash, C., Pawar, N.A., 2019. Effect of dietary synbiotic supplementation on growth, immune and physiological status of *Labeo rohita* juveniles exposed to low pH stress. Fish Shellfish Immunol. 91, 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.023>

Standen, B.T., Rodiles, A., Peggs, D.L., Davies, S.J., Santos, G.A., Merrifield, D.L., 2015. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99(20), 8403–8417. DOI 10.1007/s00253-015-6702-2

Sutriana, A., Akter, M.N., Hashim, R., Mohd Nor S.A., 2021. Effectiveness of single and combined use of selected dietary probiotic and prebiotics on growth and intestinal conditions of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage, 1978) juvenile. Aquac. Int. 29, 2769-2791. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00777-4>

Sweet, M.J., Bulling, M.T., 2017. On the Importance of the Microbiome and Pathobiome in Coral Health and Disease. Front. Mar. Sci. 4(9), 1-11. doi:10.3389/fmars.2017.00009



- Tan, C.K., Ikhsan, N.F.M., Suyub, I.B., Edward, M.J., Kaman, N., Samsudin, A.A., 2018. Comparative study of gut microbiota in wild and captive Malaysian Mahseer (*Tor tambroides*). *MicrobiologyOpen*, e00734. doi:10.1002/mbo3.734
- Terova, G., Rimoldi, S., Ascione, C., Gini, E., Ceccotti, C., Gasco, L., 2019. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota is modulated by insect meal from *Hermetia illucens* prepupae in the diet. *Rev. Fish Biol. Fish.* 29, 465–486. <https://doi.org/10.1007/s11160-019-09558-y>
- Tiengtam, N., Khempaka, S., Paengkoum, P., Boonanuntanasarn, S., 2015. Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 207, 120–129. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.05.008
- Uren Webster, T.M., Rodriguez-Barreto, D., Consuegra, S., Garcia de Leaniz, C., 2020. Cortisol-Related Signatures of Stress in the Fish Microbiome. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01621
- Volkoff, H., London, S., 2018. Nutrition and Reproduction in Fish. *Encyclopedia of Reproduction* 743–748. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.20624-9
- Walhe, R.A., Diwanay, S.S., Patole, M.S., Sayyed, R.Z., AL-Shwaiman, H.A., Alkhulaifi, M. M., Elgorban, A.M., Danish, S., Datta, R., 2021. Cholesterol Reduction and Vitamin B12 Production Study on *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus pentosus* Isolated from Yoghurt. *Sustainability* 13(11), 5853. doi:10.3390/su13115853
- Wang, L., Han, Y., Jiang, Z., Sun, M., Si, B., Chen, F., Bao, N., 2017. Interactive effects of dietary leucine and isoleucine on growth, blood parameters, and amino acid profile of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Physiol. Biochem.* 43(5), 1265–1278. doi:10.1007/s10695-017-0370-3
- Welch, T.J., Good, C.M., 2013. Mortality associated with Weissellosis (*Weissella* sp.) in USA farmed rainbow trout: Potential for control by vaccination. *Aquaculture* 388, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.021>
- Wu, P., Liu, Y., Li, C., Xiao, Y., Wang, T., Lin, L., Xie, Y., 2021. The Composition of Intestinal Microbiota From *Collichthys lucidus* and Its Interaction With Microbiota From Waters Along the Pearl River Estuary in China. *Front. Environ. Sci.* 9, 675856. doi:10.3389/fenvs.2021.675856
- Wu, S., Wang, G., Angert, E.R., Wang, W., Li, W., Zou, H., 2012. Composition, Diversity, and Origin of the Bacterial Community in Grass Carp Intestine. *PLoS ONE* 7(2), e30440. doi:10.1371/journal.pone.0030440
- Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., Liu, Z., Zhang, D., Zhu, H., Yi, M., 2018. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and

disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 76, 368–379. doi:10.1016/j.fsi.2018.03.020

Xia, Y., Wang, M., Gao, F., Lu, M., Chen, G., 2019. Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Anim. Nutr. 6:69-79. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.07.002>

Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., Yokota, A., 2011. *Thermogemmatispora onikobensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogemmatispora foliorum* sp. nov., isolated from fallen leaves on geothermal soils, and description of Thermogemmatisporaceae fam. nov. and Thermogemmatisporales ord. nov. within the class Ktedonobacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 903–910. doi: 10.1099/ijs.0.024877-0

Ye, J.-D., Wang, K., Li, F.-D., Sun, Y.-Z., 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquac. Nutr. 17(4), e902–e911. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00863.x

Yeganeh Rastekenari, H., Kazami, R., Shenavar Masouleh, A., Banavreh, A., Najjar Lashgari, S., Sayed Hassani, M.H., Ghorbani Vaghei, R., Alizadeh Roudposhti, M., Hallajian, A., 2021. Autochthonous probiotics *Lactococcus lactis* and *Weissella confusa* in the diet of fingerlings great sturgeon, *Huso huso*: effects on growth performance, feed efficiency, haematological parameters, immune status and intestinal morphology. Aquac. Res. 52(8), 3687–3695. DOI: 10.1111/are.15213

Yi, M., Wang, M., Li, Z., Liu, Z., Song, C., Zhang, D., Gao, F., Ke, X., Cao, J., Lu, M., 2019. An investigation into the effects of *Streptococcus agalactiae* on the 5-HT system and the behavior of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquac. Rep. 15, 100232. doi:10.1016/j.aqrep.2019.100232

Yih, T.H., Chen, S.-W., Hu, S.-Y., 2019. Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Shellfish Immunol. 92, 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.027>

Torres-Corral, Y., Fernández-Álvarez, C., Santos, Y., 2018. Proteomic and molecular fingerprinting for identification and tracking of fish pathogenic *Streptococcus*. Aquaculture 498, 322-334. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.08.041

Yones, A.M.A.S.M., Mohamed Eissa, I.A.-M.M., Ghobashy, M.A.E-F.A., Marzok, S.S., 2020. Effects of Dietary Inulin as Prebiotic on Growth Performance, Immuno-haematological Indices and Ectoparasitic Infection of Fingerlings Nile Tilapia, *Oreochromis Niloticus*. Egypt. J. Histol. 43(1), 88-103. doi: 10.21608/ejh.2019.15495.1152

Yoshii, K., Hosomi, K., Sawane, K., Kunisawa, J., 2019. Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity. Front. Nutr. 6. doi:10.3389/fnut.2019.00048

Yousefian, M., Amiri, M.S., 2009. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *Afr. J. Biotechnol.* 8(25), 7313-7318. ISSN 1684–5315

Zehra, S., Khan, M.A., 2013. Dietary isoleucine requirement of fingerling catla, *Catla catla* (Hamilton), based on growth, protein productive value, isoleucine retention efficiency and carcass composition. *Aquac. Int.* 21(6), 1243–1259. doi:10.1007/s10499-013-9627-8

Zhang, C., Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Li, H., Zhang, L., 2008. Dietary lysine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture* 283, 123–127. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.035

Zhang, P., Yang, F., Hu, J., Han, D., Liu, H., Jin, J., Yang, Y., Yi, J., Zhu, X., Xie, S., 2020. Optimal form of yeast cell wall promotes growth, immunity and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquac. Rep.* 18, 100465. doi:10.1016/j.aqrep.2020.100465

Zhao, J., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Chen, G., Jiang, W., Li, S., Tang, L., Kuang, S., Feng, L., Zhou, X., 2012. Effects of dietary isoleucine on growth, the digestion and absorption capacity and gene expression in hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 368-369, 117–128. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.09.019

## VIII. DISCUSIÓN GENERAL

La actividad acuícola aumenta año con año, misma que refleja el incremento de la demanda de recursos de cultivo por los requerimientos nutricionales de la población mundial que también está en constante crecimiento, la cual se prevé sea de 10,000 millones para el año 2050 (FAO 2018). Para solventar esta demanda, se ha implementado el cultivo superintensivo, el cual causa condiciones de alto estrés en los organismos cultivados, condición que los hace susceptibles a adquirir enfermedades bacterianas, fúngicas, parasitarias y virales que llegan a ocasionar mortalidades masivas y graves pérdidas económicas (Tavares-Dias y Martins 2017).

Una alternativa viable para incrementar la producción acuícola y que se viene aplicando en los últimos años es la adición de suplementos prebióticos, probióticos y simbióticos, los cuales se ha observado que presentan efectos positivos en el incremento del crecimiento de los organismos cultivados y, a su vez, influyen directamente en la modulación de la microbiota (Anexo 1), la cual tiene múltiples funciones en el hospedero (Guangxin *et al.* 2022).

Antes de definir los distintos efectos de prebióticos, probióticos y simbióticos sobre los organismos a los que se aplican como parte de su dieta, es importante conocer primero cuales son las condiciones normales (sin adición de estos suplementos) de estos en cultivo, su requerimiento alimenticio y las características de su crecimiento, supervivencia, y microbiota intestinal.

Así en el presente trabajo, se describe inicialmente (capítulo 1) la microbiota intestinal del pez blanco de Pátzcuaro en distintos hábitats de desarrollo como son el ambiente silvestre (Lago de Pátzcuaro), el Cultivo Intensivo y el Cultivo Extensivo. En el capítulo 2 se analizan los efectos de la aplicación de suplementos prebióticos y simbióticos sobre la microbiota intestinal y el crecimiento de *C. estor* en condiciones de cultivo. Cabe señalar que este es el primer estudio en definir la microbiota intestinal del pez blanco *C. estor* en etapa adulta en distintos ambientes de desarrollo.

En los resultados de la microbiota intestinal de peces adultos de diferentes ambientes, se encontró que la diversidad bacteriana ha sido significativamente más alta en peces provenientes del lago de Pátzcuaro comparada con la del cultivo

intensivo. Este cambio significativo en la diversidad entre ambientes Lago y cultivo intensivo se puede explicar por el hábito alimenticio de *C. estor* al ser zooplantófago (Ross *et al.* 2006, Martínez-Palacios *et al.* 2007, Martínez-Palacios *et al.* 2019) y por la gran diferencia de la diversidad de estos organismos planctónicos en el ambiente dinámico Lago, los cuales pueden contribuir a esta diversidad en comparación de un ambiente menos dinámico como el cultivo controlado, donde los peces se alimentan con una dieta balanceada en forma exclusiva.

En cuanto a los efectos de los prebióticos y simbióticos sobre la microbiota intestinal de juveniles de *C. estor*, se notó una variación entre los tratamientos aplicados, en particular entre las bacterias ácido lácticas. Los dos tratamientos simbióticos (*Lactobacillus* + inulina y *Lactobacillus* + pared celular) incrementaron significativamente la abundancia de *Lactobacillus* comparada con los tratamientos testigo y solo prebióticos (inulina y pared celular). Mientras que el tratamiento simbiótico *Lactobacillus* + inulina incrementó otras bacterias ácido lácticas como *Lactococcus*, *Weissella* y *Enterococcus* cuando se comparó con los tratamientos testigo y el prebiótico pared celular. También, con el prebiótico inulina incrementó *Enterococcus* cuando se comparó con el testigo, y *Lactobacillus* y *Weissella* cuando se comparan con el prebiótico pared celular, así como *Enterococcus* y *Streptococcus* cuando se comparan con el simbiótico *Lactobacillus* + pared celular.

Lo encontrado en los dos capítulos de este trabajo, también se ha visto en diferentes estudios de peces de agua dulce y marinos, donde cambios del hábitat y aplicación de dietas con suplementos prebióticos y simbióticos modulan la microbiota intestinal, con incremento de la diversidad bacteriana en un ambiente silvestre más dinámico comparado con uno más estable como el cultivo (Givens *et al.* 2015, Hennersdorf *et al.* 2016, Dehler *et al.* 2017), y por incremento de bacterias dependientes de sustratos prebióticos (Mahious *et al.* 2006, Reza *et al.* 2009, Geraylou *et al.* 2012, Wang *et al.* 2022) e influenciadas por la presencia de simbióticos, entre ellas las bacterias ácido lácticas (Mouriño *et al.* 2012, González-Félix *et al.* 2018).

En diferentes estudios se destacan que las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* están presentes en el intestino de peces de agua dulce y marinos (Merrifield *et al.*

2014, Alonso *et al.* 2018, Ringø *et al.* 2018). La presencia y abundancia de estas bacterias está influenciada por factores como la estación del año (Hagi *et al.* 2004), el estrés (Uren Webster *et al.* 2020), la salinidad (Ringø y Strøm 1994, Lin *et al.* 2020) y la adición a la dieta de suplementos prebióticos, probióticos y simbióticos (Reza *et al.* 2009, Akrami *et al.* 2013, Cerezuela *et al.* 2013, Geraylou *et al.* 2012, Hoseinifar *et al.* 2013, Hoseinifar *et al.* 2015, Momeni-Moghaddam *et al.* 2015, Standen *et al.* 2015, Falcinelli *et al.* 2016, Akter *et al.* 2019, Tan *et al.* 2019).

Las bacterias ácido lácticas presentes en peces marinos y de agua dulce como *C. ester*, también son moduladas por prebióticos y simbióticos. En múltiples investigaciones, a estas bacterias se les han atribuido funciones de reducción del pH del intestino como producto de la síntesis de ácido acético, ácido láctico y ácido propiónico, reduciendo así también el crecimiento de bacterias patógenas (Mussatto y Mancilha 2007, Yousefian y Amiri 2009, Ringø *et al.* 2018, Hoseinifar *et al.* 2020). Por otro lado, estas bacterias tienen distintas cualidades, los *Lactobacillus* tienen la capacidad de realizar la síntesis de aminoácidos como isoleucina, leucina, lisina y valina (Dai *et al.* 2011, Hao *et al.* 2011, Neis *et al.* 2015), metabolitos que cuando se administran como parte de la dieta de los peces, aumentan el crecimiento, la eficiencia alimentaria y la proteína muscular (Ahmed y Khan 2006, Zhang *et al.* 2008, Zhao *et al.* 2012, Dong *et al.* 2013, Zehra y Khan 2013, Gan *et al.* 2014, Wang *et al.* 2017, Huang *et al.* 2018). En otros estudios se ha encontrado que *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* sintetizan vitaminas del complejo B (Rossi *et al.* 2011, Yoshii *et al.* 2019, Walhe *et al.* 2021), que están relacionadas con el crecimiento, el desarrollo de embriones y larvas de peces (Sarker *et al.* 2012, Volkoff y London 2018).

Para el caso de *Weissella*, la cual fue otra bacteria ácido láctica modulada por la aplicación de prebióticos y simbióticos en *C. ester*, se ha determinado que algunas especies de este género son patógenas en peces (Liu *et al.* 2009, Figueiredo *et al.* 2012, Welch y Good 2013, Costa *et al.* 2015). Sin embargo, se ha estudiado y aplicado también como probiótico para producir bacteriocinas (Masuda *et al.*, 2011; Goh y Philip, 2015; Li *et al.*, 2017). Además, cuando se aplica a dietas de peces, presenta efectos positivos en la mejora del crecimiento (Kahyani *et al.* 2021,

Yeganeh-Rastekenari *et al.* 2021). Teniendo en cuenta las características positivas de estas bacterias ácido lácticas encontradas en *C. estor* y su modulación por la adición de prebióticos y simbióticos, pudieran ser aprovechadas para incrementar en el desempeño *C. estor* en cultivo. Sin embargo, es importante destacar que para saber las funciones de estas bacterias en *C. estor*, es imperativo realizar estudios a mayor profundidad tales como análisis funcionales a través de secuenciación shotgun, análisis de expresión de genes por transcriptómica y análisis de perfil de metabolitos por metabolómica, para contar con mayor información y poder aplicar estas bacterias como aditivos en dietas experimentales, ya que se ha determinado que especies del mismo género, incluso cepas de la misma especie bacteriana, pueden variar su función (Brunt y Austin 2005, Pieters *et al.* 2008, Gunasekara *et al.* 2010, Lim *et al.* 2010, Huebner *et al.* 2011, Lü *et al.* 2011, Gómez-Duarte 2014, Ramesh *et al.* 2015, Guardiola-Álvarez *et al.* 2016, Behera *et al.* 2017, Wanka *et al.* 2018).

A pesar de los cambios observados en la modulación de la microbiota intestinal, tanto en los peces de diferentes ambientes (capítulo 1), como en los peces del experimento con prebióticos y simbióticos (capítulo 2), se notó que permanece una microbiota núcleo (“core” microbiota) compuesta por los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Weissella* para ambientes, y *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* y *Thermogemmatispora* para los juveniles alimentados con prebióticos y simbióticos, estando presente *Bacillus* y *Spiroplasma* tanto en juveniles como en adultos.

En la microbiota núcleo identificada tanto en el intestino de peces adultos como de los juveniles de los tratamientos experimentales, destaca que la mayoría de los géneros (excepto *Spiroplasma* y *Thermogemmatispora*) también han sido encontrados como parte de la core microbiota calculada para peces de agua dulce y marinos (Roeselers *et al.* 2011, Gajardo *et al.* 2016, Dehler *et al.* 2017, do Vale-Pereira *et al.* 2017, Jiang *et al.* 2018, Larios-Soriano *et al.* 2018, Nikouli *et al.* 2018, Tan *et al.* 2018, Jiang *et al.* 2019, Piazzon *et al.* 2019, Rimoldi *et al.* 2019, Feng *et al.* 2021, Park y Kim 2021, Wu *et al.* 2021). Estos géneros bacterianos persisten en

estos peces a pesar de que los hospedadores poseen diferentes condiciones dietéticas y ambientales de desarrollo, lo que puede significar su relevancia ecológico-funcional en el organismo que habitan, ya que en múltiples estudios se les han atribuido diferentes funciones como la producción de ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos y bacteriocinas, mismas que están involucradas en el incremento de crecimiento, supervivencia, producción de enzimas digestivas, eficiencia alimentaria y el aumento de la proteína muscular en peces de agua dulce y marinos (Bringel y Hubert 2003, Ahmed y Khan 2006, Khan y Abidi 2007, Hu *et al.* 2008, Zhao *et al.* 2012, Dong *et al.* 2013, Gan *et al.* 2014, Hashemimofrad *et al.* 2016, Jiang *et al.* 2017, Abarike *et al.* 2018, Lee *et al.* 2018, Zaineldin *et al.* 2018, Xia *et al.* 2020, Kahyani *et al.* 2021). Aunque muchas bacterias de estos géneros tienen funciones benéficas, algunas de ellas a nivel de especie han sido clasificadas como patógenas para peces (Austin *et al.* 1995, Taoka *et al.* 2006, Pieters *et al.* 2008, Abd El-Rhman *et al.* 2009, Lü *et al.* 2011, Korkea-aho *et al.* 2012, Mouriño *et al.* 2012, Qi *et al.* 2020, Tran *et al.* 2020, Estante-Superio *et al.* 2021, Vestrum *et al.* 2022).

Se encontraron dos géneros en la core microbiota de *C. estor*, que no se han reportados en otros peces. El primero es *Thermogemmatispora* se ha encontrado en abundancia en fuentes geotermales (Yabe *et al.* 2011, King y King 2014) y en el suelo (Khodadad *et al.* 2020), por lo que es posible que *Chirostoma estor* pudo adquirir este género del agua de donde se cultiva, la cual proviene de un pozo de una profundidad de 170 metros donde la temperatura es superior a la ambiental. El segundo es *Spiroplasma* las cuales son bacterias consideradas comensales en la mayoría de los insectos, arácnidos, crustáceos y plantas (Cisak *et al.* 2015), sin embargo, se han encontrado también cepas patógenas en algunos crustáceos (Nunan *et al.* 2005, Ding *et al.* 2014). Recientemente se ha definido *Spiroplasma* como simbionte del pepino de mar de la fosa de las Marianas (He *et al.* 2017) y de las moscas *Drosophila* (Gerth *et al.* 2021). En peces existen pocos estudios acerca de este género, Lin *et al.* (2018) indicaron que *Spiroplasma* añadido a la dieta de la anguila *Anguilla marmorata* reduce el crecimiento, mientras que Ruzauskas *et al.* (2021) mencionan que *Spiroplasma* predomina en *Cyprinus carpio* de estanques y relacionan la presencia y abundancia de esta bacteria con el consumo de insectos



por parte de estos peces. En cuanto a esta bacteria en *C. estor*, anteriormente se ha definido que este pez consume insectos si están cerca de su entorno acuático (Martínez-Palacios *et al.* 2019), por lo que podría estar adquiriendo esta bacteria a partir de su hábito alimenticio, e incluso podría existir alguna asociación simbiótica. Sin embargo, son necesarios más estudios como transcriptómica, metabolómica y análisis fisiológicos para reafirmar esta asociación.

Respecto a los resultados en mejora del crecimiento se observó que la aplicación de simbióticos en la dieta de juveniles de *C. estor*, mejoró de forma significativa la longitud y el peso corporal final, la ganancia de peso, la tasa de ganancia de peso, la tasa de crecimiento específica y el factor de condición cuando se comparó con el resto de los tratamientos. Estos resultados muestran que los simbióticos tienen mejores efectos en el crecimiento que al aplicar prebióticos y probióticos separados, lo cual se ha observado anteriormente en otros peces como trucha arcoíris (Rodríguez-Estrada *et al.* 2009), cobia (Geng *et al.* 2011), lenguado (Hasan *et al.* 2018) y bagre (Sutriana *et al.* 2021).

En términos de procesos de preparación y almacenamiento de dietas con pre-, pro- y simbióticos, los prebióticos tienen la ventaja de que al ser aplicados al resto de los componentes de una dieta balanceada, no es necesaria alguna técnica especializada. En cambio, la administración de forma exitosa de los probióticos de forma separada o como simbióticos, es un proceso costoso debido a los precios de medios de cultivo para crecer las bacterias probióticas previo a la aplicación en las dietas y al tiempo invertido. Aunado a esto, para una adecuada administración y funcionalidad de estos microorganismos, se han detectado problemas que incluyen la baja viabilidad de las bacterias probióticas durante el procesamiento y el almacenamiento (Merrifield *et al.* 2010, Egerton *et al.* 2018). Por lo anterior y además del resultado de mejora del crecimiento por el tratamiento prebiótico pared celular en *C. estor*, para un futuro se pueden diseñar experimentos con distintas dosis y tiempos de aplicación de este prebiótico con la finalidad de determinar la dosis con la mejor eficiencia y ver sus efectos en esta especie, como una potencial forma de mejorar la producción en su cultivo.

En cuanto a la relación microbiota-crecimiento se ha definido que existe una relación positiva en la presencia del género *Lactobacillus* con los valores en el incremento del crecimiento, sin embargo, no se sabe exactamente la relación causal de dicha relación. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios y análisis como la expresión génica de las bacterias y de los peces, los metabolitos que pueden producir las bacterias y cómo pueden estar directamente relacionados con el crecimiento de los peces, para finalmente definir esta relación bacterias-crecimiento en *C. estor*.

El análisis de predicción de vías metabólicas bacterianas por PICRUST2 predice la presencia de vías sobreexpresadas del metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, cofactores, energía y vitaminas para las muestras de intestino anterior de cultivo intensivo y digesta de los tres ambientes (capítulo 1), y para las muestras de inulina y *Lactobacillus* + pared celular (capítulo 2). Estos resultados proporcionan datos para apoyar funciones de la microbiota (Douglas *et al.* 2019) y fundamentar investigaciones futuras. Sin embargo, es importante señalar que los resultados de PICRUST2 podrían no representar realmente a las bacterias y por tanto, su papel en el hospedero, ya que esta herramienta considera la predicción funcional de bacterias identificadas únicamente por una región de su genoma (en este caso la región V3 del gen RNAr 16S). Será necesario realizar estudios funcionales de profundidad (estudios ómicos) para corroborar la funcionalidad de la microbiota en esta especie.

El pez blanco del Lago de Pátzcuaro *C. estor*, organismo de estudio del presente trabajo, es considerado una especie de lento crecimiento, lo cual a nivel de producción es un problema. Además, es un importante recurso nativo y endémico con potencial acuícola, y se puede considerar un organismo modelo clave en función de tener un intestino corto sin estómago, y consumir zooplancton, siendo así un consumidor bajo en la cadena trófica (Ross *et al.* 2006, Martínez-Palacios *et al.* 2019). Por otro lado, tiene la particularidad de sintetizar y acumular grandes cantidades de ácidos grasos omega 3, específicamente DHA (Fonseca-Madrigal *et al.* 2014, Martínez-Palacios *et al.* 2020). Martínez-Palacios *et al.* (2020) determinaron que en peces *C. estor* adultos silvestres provenientes del Lago Pátzcuaro, la proporción de DHA con respecto a los otros ácidos grasos es de 30.95%, mientras que en peces adultos en condiciones de cultivo, indicaron que la proporción de DHA

es de 21.61%. En el presente trabajo, a partir de muestras de peces juveniles provenientes del experimento de prebióticos y simbióticos, también se realizó el análisis del perfil de ácidos grasos, ya que se ha visto que la adición de suplementos prebióticos y probióticos en peces modula la presencia de ácidos grasos (Piccolo *et al.* 2013, Baesi *et al.* 2017). En este caso no se observaron diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos entre los tratamientos (testigo, prebióticos y simbióticos) (Apéndice 1). Sin embargo, cuando se calculó la proporción de los ácidos grasos DHA/EPA, el tratamiento prebiótico pared celular fue significativamente menor que el tratamiento testigo. Además, la proporción de DHA en los peces de todos los tratamientos varió entre entre 16.49 y 19.74%, con una tendencia hacia el incremento del porcentaje de este ácido graso en los tratamientos prebiótico inulina y simbióticos con respecto al tratamiento testigo. La tabla del perfil de ácidos grasos y discusión de los resultados se encuentran en el Apéndice 1.

Finalmente, es importante señalar que sería interesante el estudio de las potenciales bacterias probióticas que han sido determinadas como parte de la “core” microbiota de peces blancos *C. estor* provenientes de los ambientes estudiados y de los tratamientos del experimento. A partir de su aplicación en la dieta de peces de cultivo, se pueden determinar sus efectos sobre el crecimiento, la supervivencia, la microbiota y morfología intestinal, perfil de metabolitos, expresión de genes bacterianos, expresión de genes de los peces, así como sus efectos sobre el perfil de ácidos grasos presentes en los peces.

## IX. CONCLUSIONES

La microbiota intestinal del pez blanco (*C. estor*) tiene variaciones significativas cuando este organismo cambia su hábitat de silvestre a cautiverio, y cuando se adiciona su dieta con suplementos prebióticos y simbióticos. Sin embargo, a pesar de estos cambios, se mantiene la presencia de algunos géneros de microorganismos que denominamos la “core” microbiota del pez blanco, misma que tiene potencial de aislarse, identificarse a nivel especie, cultivarse, y aplicarse como probióticos en el cultivo intensivo de esta especie, como una forma de potencializar el crecimiento y la supervivencia.

Además, en este estudio se comprobó que la aplicación de simbióticos *Lactobacillus* + inulina y *Lactobacillus* + pared celular, así como el prebiótico pared celular, mejoraron considerablemente el crecimiento comparado con la dieta balanceada administrada en esta especie, por lo que se recomienda usar estos suplementos en esta especie. Sin embargo, es importante señalar que sería interesante utilizar diferentes dosis y tiempos de aplicación de pared celular con la finalidad de conocer si los efectos vistos en el presente estudio pueden ser mejorados, para así poderlos aplicarlos en gran escala en el cultivo de esta especie.

La aplicación de simbióticos incrementó considerablemente la abundancia de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas, las cuales se han visto involucradas en la mejora de las condiciones de cultivo de peces. A partir del análisis de relación de abundancia de bacterias con índices del crecimiento, se determinó que el género *Lactobacillus* está directamente relacionado con el incremento en el crecimiento del pescado blanco. Sin embargo, no sabemos los mecanismos moleculares presentes en esta relación, por lo que son necesarios estudios a mayor profundidad para definirla de forma clara.

Finalmente, la información generada en este trabajo aporta al conocimiento científico que podrá usarse como referencia para definir cambios de la microbiota en *C. estor* por influencia de distintos factores como cambios de hábitats de desarrollo y mejoramiento de dietas.

## X. APÉNDICES

### A1. Análisis del perfil de ácidos grasos experimento prebióticos y simbióticos

Dada la gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados que posee el pez blanco (21.61-30.95% de DHA en proporción al resto de los ácidos grasos; Martínez-Palacios *et al.* 2020), en el muestreo del experimento, también se tomaron muestras de peces con la finalidad de realizar análisis del perfil de ácidos grasos, ya que se ha visto en algunos peces que la adición de suplementos prebióticos y probióticos modula la presencia del contenido de ácidos grasos (Piccolo *et al.* 2013, Baesi *et al.* 2017).

#### A1.1 Resultados análisis perfil de ácidos grasos

Los resultados del efecto de los prebióticos y simbióticos sobre el perfil de ácidos grasos en el pez blanco en la semana 12 están mostrados en la Tabla A1.

El ácido palmítico (16:0) y el ácido oleico (18:1n-9) fueron los ácidos grasos saturados y monoinsaturados predominantes en todos los tratamientos. Entre los ácidos grasos poliinsaturados, el ácido linoleico (18:2n-6) y el DHA (22:6n-3) fueron los más prevalentes entre los tratamientos. Hay una tendencia hacia el incremento (no diferencias significativas) del porcentaje de DHA en los tratamientos prebiótico inulina y simbióticos con respecto al tratamiento testigo y una tendencia de incremento del porcentaje de EPA en todos los tratamientos prebióticos y simbióticos con respecto al tratamiento testigo.

En cuanto a los análisis estadísticos, se puede ver que en todos los ácidos grasos analizados no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el tratamiento testigo y los tratamientos prebióticos y simbióticos (Tabla A1). Entre las proporciones ácidos grasos poliinsaturados / ácidos grasos saturados (PUFA/SFA) y ácidos grasos omega 3 / ácidos grasos omega 6 ( $\omega 3 / \omega 6$ ) no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla A1). Sin embargo, en la proporción de los ácidos grasos DHA/EPA, el tratamiento prebiótico pared celular fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que en el tratamiento testigo (Tabla A1).

**Tabla A1.** Perfil de ácidos grasos de peces blancos *Chirostoma estor* eviscerados alimentados con prebióticos y simbióticos (Promedio  $\pm$  Desviación estándar). Los valores reportados son promedios de tres peces por tratamiento. Los valores en la misma fila que tienen diferentes letras corresponden a tratamientos significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Ácido graso	Tratamiento				
	Testigo	Inulina	Pared celular	<i>Lactobacillus</i> + Inulina	<i>Lactobacillus</i> + Pared celular
C14:0	4.18 $\pm$ 0.26 a	3.86 $\pm$ 0.20 a	4.15 $\pm$ 0.39 a	3.97 $\pm$ 0.62 a	3.66 $\pm$ 0.13 a
C15:0	0.41 $\pm$ 0.01 a	0.42 $\pm$ 0.04 a	0.45 $\pm$ 0.01 a	0.47 $\pm$ 0.06 a	0.45 $\pm$ 0.01 a
C16:0	23.77 $\pm$ 2.73 a	23.37 $\pm$ 0.64 a	24.06 $\pm$ 0.55 a	23.70 $\pm$ 1.18 a	23.83 $\pm$ 0.81 a
C18:0	5.76 $\pm$ 1.32 a	6.02 $\pm$ 0.51 a	5.35 $\pm$ 0.54 a	5.90 $\pm$ 1.03 a	5.83 $\pm$ 0.22 a
Total SFA	34.12 $\pm$ 3.80 a	33.67 $\pm$ 1.10 a	34.01 $\pm$ 0.62 a	34.04 $\pm$ 1.54 a	33.78 $\pm$ 1.10 a
C16:1n-7	5.05 $\pm$ 0.63 a	4.60 $\pm$ 0.16 a	4.81 $\pm$ 0.46 a	4.43 $\pm$ 0.53 a	4.32 $\pm$ 0.21 a
C18:1(n-7)	3.93 $\pm$ 0.18 a	3.70 $\pm$ 0.05 a	3.82 $\pm$ 0.16 a	3.70 $\pm$ 0.14 a	3.72 $\pm$ 0.12 a
C18:1(n-9)	18.67 $\pm$ 1.15 a	16.87 $\pm$ 0.87 a	18.84 $\pm$ 1.05 a	15.96 $\pm$ 0.50 a	16.57 $\pm$ 1.08 a
C20:1(n-9, n-11)	0.46 $\pm$ 0.03 a	0.43 $\pm$ 0.06 a	0.50 $\pm$ 0.04 a	0.40 $\pm$ 0.08 a	0.45 $\pm$ 0.02 a
Total MUFA	28.11 $\pm$ 0.77 a	25.60 $\pm$ 0.87 a	27.97 $\pm$ 1.49 a	24.28 $\pm$ 0.67 a	25.07 $\pm$ 1.18 a
C18:2(n-6)	11.29 $\pm$ 1.47 a	11.21 $\pm$ 0.28 a	11.27 $\pm$ 0.89 a	11.13 $\pm$ 0.77 a	10.96 $\pm$ 0.53 a
C18:3(n-3)	1.28 $\pm$ 0.35 a	1.41 $\pm$ 0.05 a	1.41 $\pm$ 0.19 a	1.39 $\pm$ 0.24 a	1.41 $\pm$ 0.07 a
C18:4(n-3)	0.37 $\pm$ 0.16 a	0.45 $\pm$ 0.07 a	0.43 $\pm$ 0.07 a	0.47 $\pm$ 0.13 a	0.45 $\pm$ 0.02 a
C20:4(n-3)	0.23 $\pm$ 0.07 a	0.28 $\pm$ 0.01 a	0.24 $\pm$ 0.03 a	0.27 $\pm$ 0.03 a	0.26 $\pm$ 0.04 a
C20:4(n-6)ARA	2.21 $\pm$ 0.03 a	2.45 $\pm$ 0.06 a	2.26 $\pm$ 0.24 a	2.54 $\pm$ 0.21 a	2.52 $\pm$ 0.14 a
C20:5(n-3)EPA	2.68 $\pm$ 0.54 a	3.22 $\pm$ 0.35 a	3.55 $\pm$ 0.33 a	3.53 $\pm$ 0.55 a	3.13 $\pm$ 0.08 a
C22:5(n-3)	2.62 $\pm$ 0.53 a	2.76 $\pm$ 0.30 a	2.37 $\pm$ 0.02 a	2.64 $\pm$ 0.08 a	2.67 $\pm$ 0.46 a
C22:6(n-3)DHA	17.09 $\pm$ 1.27 a	18.95 $\pm$ 0.45 a	16.49 $\pm$ 1.78 a	19.51 $\pm$ 0.65 a	19.74 $\pm$ 1.64 a
Total PUFA	37.77 $\pm$ 4.33 a	40.73 $\pm$ 0.70 a	38.02 $\pm$ 1.01 a	41.47 $\pm$ 0.95 a	41.15 $\pm$ 2.26 a
$\omega$ 3	24.27 $\pm$ 2.86 a	27.07 $\pm$ 0.68 a	24.49 $\pm$ 1.66 a	27.80 $\pm$ 0.39 a	27.67 $\pm$ 1.95 a
$\omega$ 6	13.50 $\pm$ 1.48 a	13.66 $\pm$ 0.22 a	13.53 $\pm$ 0.65 a	13.67 $\pm$ 0.57 a	13.48 $\pm$ 0.52 a
PUFA/SFA	1.13 $\pm$ 0.27 a	1.21 $\pm$ 0.06 a	1.12 $\pm$ 0.02 a	1.22 $\pm$ 0.08 a	1.22 $\pm$ 0.11 a
$\omega$ 3/ $\omega$ 6	1.80 $\pm$ 0.03 a	1.98 $\pm$ 0.06 a	1.82 $\pm$ 0.20 a	2.04 $\pm$ 0.06 a	2.05 $\pm$ 0.12 a
DHA/EPA	6.49 $\pm$ 0.79 a	5.92 $\pm$ 0.56 ab	4.65 $\pm$ 0.52 b	5.63 $\pm$ 1.03 ab	6.29 $\pm$ 0.36 ab

## A1.2 Discusión análisis perfil de ácidos grasos

En los resultados del presente estudio, el ácido palmítico (16:0) y el ácido oleico (18:1n-9) fueron los ácidos grasos saturados y monoinsaturados predominantes entre los tratamientos. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de estos ácidos. En otros trabajos de peces se ha determinado que estos ácidos grasos están presentes en gran cantidad (Gutierrez y da Silva 1993, Piccolo *et al.* 2013, Baesi *et al.* 2017) y su concentración puede estar influenciada por la

aplicación de prebióticos y probióticos. Por ejemplo, Piccolo *et al.* (2013) al aplicar el prebiótico MOS en el pez sargo *Diplodus puntazo*, mostraron que este ingrediente incrementó significativamente la cantidad de los ácidos palmítico y oleico comparada con el tratamiento testigo. En otro estudio, Baesi *et al.* (2017) al aplicar el probiótico *Lactobacillus* en la carpa *Cyprinus carpio*, encontraron que este microorganismo también incrementó significativamente la cantidad de los ácidos palmítico y oleico comparada con el tratamiento testigo.

Es bien sabido que los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega 3$  como DHA y EPA contenido en los peces, tienen una función importante en la salud humana (Baesi *et al.* 2017). En el presente estudio, en el análisis de los ácidos grasos poliinsaturados (incluidos EPA y DHA), no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el tratamiento testigo y los tratamientos prebióticos y simbióticos. Sin embargo, existe una tendencia al incremento en el EPA en todos los tratamientos respecto al testigo. También hay una tendencia al incremento de DHA en todos los tratamientos respecto al testigo, excepto el tratamiento del prebiótico pared celular donde la tendencia es hacia la reducción. En otros estudios de peces también se ha analizado el efecto de la aplicación de prebióticos y probióticos sobre el perfil de los ácidos grasos poliinsaturados EPA y DHA, cuyos resultados son contrarios al presente, con una reducción de estos. Piccolo *et al.* (2013) al aplicar los prebióticos inulina y mananooligosacáridos (MOS) en el pez sargo *Diplodus puntazo*, mostraron que estos suplementos redujeron significativamente la cantidad de EPA comparada con el tratamiento testigo. En otro estudio, Baesi *et al.* (2017) al aplicar el probiótico *Lactobacillus* en la carpa *Cyprinus carpio*, encontraron que se redujo significativamente la cantidad de EPA y DHA comparada con el tratamiento testigo. En el estudio de los ácidos grasos, las proporciones de omega-3 sobre omega-6 ( $\omega 3/\omega 6$ ) y PUFAS sobre ácidos grasos saturados (PUFA/SFA) son importantes para la perspectiva nutricional (Baesi *et al.* 2017). Pigott y Tucker (1990) indican que la proporción  $\omega 3/\omega 6$  puede ser el mejor indicador para medir el valor nutritivo del aceite de pescado. De acuerdo a Kinsella *et al.* (1988), la proporción de omega 3 y omega 6 en la dieta humana mediante la reducción de los lípidos plasmáticos, previene las enfermedades cardíacas y reduce el riesgo de cáncer. La cantidad de la proporción

de ácidos grasos omega 3 y omega 6 recomendada por los nutricionistas es superior a 0.25 veces ( $\omega 3/\omega 6$ ) (Valencia *et al.* 2006).

En la carpa *Cyprinus carpio*, Baesi *et al.* (2017) al medir la influencia del probiótico *Lactobacillus* sobre esta proporción  $\omega 3/\omega 6$ , encontraron que el intervalo esta proporción fue de 0.12 y 0.24 veces en todos los tratamientos incluido el testigo y notaron que el probiótico incrementó significativamente esta proporción comparada con el testigo. En otros peces de agua dulce como tilapia *Oreochromis niloticus*, pez cabeza de serpiente *Channa striatus*, anabas *Anabas testudineus* y bagre africano *Clarias gariepinus* en dieta común sin adición de probióticos y prebióticos, está proporción  $\omega 3/\omega 6$  es menor a 1.53 (Suloma *et al.* 2008).

En el presente trabajo en el pez blanco *Chirostoma estor*, la proporción de  $\omega 3/\omega 6$  en todos los tratamientos fue de intervalo entre 1.80 y 2.14 veces. No hubo incremento significativo de esta proporción entre los tratamientos aplicados de prebióticos y simbióticos. No obstante, existe una tendencia al incremento de la proporción  $\omega 3/\omega 6$  en todos los tratamientos respecto al testigo, excepto el tratamiento del prebióticos de pared celular donde es muy similar con el tratamiento testigo. La proporción de  $\omega 3/\omega 6$  que encontramos en el presente trabajo, aunque no haya sido significativamente influenciada por prebióticos y simbióticos, los valores encontrados son 7 veces mayores al valor mínimo recomendado por los nutricionistas, lo cual hace evidente la importancia nutritiva superior de este pez blanco sobre otros de agua dulce como la carpa, la tilapia y bagre en cuanto al contenido ácidos grasos que pueden beneficiar si se consume este recurso alimenticio.

En el presente trabajo, la proporción de estas ácidos grasos en todos los tratamientos fue de intervalo entre 1.12 y 1.26 veces. No hubo incremento significativo de esta proporción entre los tratamientos aplicados de prebióticos y simbióticos. No obstante, existe una tendencia al incremento de la proporción PUFA/SFA en todos los tratamientos respecto al testigo, excepto el tratamiento del prebióticos de pared celular donde es muy similar con el tratamiento testigo. En la carpa *Cyprinus carpio*, Baesi *et al.* (2017) al medir la influencia del probiótico *Lactobacillus* sobre esta proporción PUFA/SFA, encontraron que el intervalo esta proporción fue de 0.94 y 1.79 en todos los tratamientos incluidos el testigo y también



observaron que el probiótico redujo significativamente esta proporción comparada con el testigo.

Como conclusión de este apartado del análisis de perfil de ácidos grasos en *Chirostoma estor*, los prebióticos y los simbióticos tienden a incrementar el perfil de los ácidos grasos EPA, DHA (excepto prebiótico pared celular) y la proporción de  $\omega 3/\omega 6$  y PUFA/SFA (sin diferencias significativas). Para corroborar estos resultados y tal vez llegar a cambios estadísticamente significativos, se sugiere realizar nuevos experimentos con dietas donde se incremente la cantidad de estos suplementos aplicados en la dieta. Además, es importante señalar que sería interesante probar potenciales probióticos determinados como parte de la core microbiota de peces blancos de los ambientes y de los tratamientos del experimento analizados, con fin de determinar también sus efectos sobre el perfil de ácidos grasos.

## **A2. Análisis metabólico.**

### **A2.1 Extracción de muestras para el análisis de metabolitos**

Para el análisis de metabolitos de ambientes, el intestino de las muestras de peces de cada ambiente de desarrollo (Lago de Pátzcuaro, LP; Cultivo Intensivo, C y Cultivo Extensivo, E) se removió con unas pinzas estériles y se separó de este la mitad de la Digesta (D) y, se partió la mitad del intestino anterior (A) y la mitad del intestino posterior (P) para enseguida colocar una de estas mitades dentro de distintos tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles y etiquetados. Una vez colocadas las mitades de estas muestras en los tubos, inmediatamente los tubos con las muestras se colocaron en nitrógeno líquido para después almacenarlas a -80 °C hasta su procesamiento y posterior análisis de metabolitos por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN o NMR por sus siglas en inglés).

Para el análisis de metabolitos del experimento, el intestino de las muestras de peces de cada tratamiento se removió con unas pinzas estériles y se separó de este la mitad para enseguida colocar una de estas mitades dentro de distintos tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles y etiquetados. Una vez colocadas las mitades de estas muestras en los tubos, inmediatamente los tubos con las muestras se colocaron en nitrógeno líquido para después almacenarlas a -80 °C hasta su procesamiento y posterior análisis de metabolitos por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN o NMR por sus siglas en inglés).

### **A2.2 Prueba para determinar metabolitos en intestino e hígado de pez blanco por Resonancia Magnética Nuclear**

Mientras que las distintas muestras de ambientes y del experimento se mantuvieron almacenadas en ultracongelación en espera de su procesamiento y análisis por RMN, se realizó un experimento de prueba de extracción de metabolitos donde muestras de intestinos e hígados de pez blanco se procesaron de diferente manera y se enviaron a analizar por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear para ver la viabilidad de la prueba con las diferentes características de procesamiento y decidir así, cual tipo de muestra sería más viable preparar y enviar para uno de nuestros objetivos de trabajo que es el determinar los metabolitos en la digesta e intestinos anterior y posterior del peces blancos *Chirostoma estor* adultos que están en

distintos ambientes de desarrollo y metabolitos en intestino de del peces blancos *Chirostoma estor* juveniles alimentados con suplementos prebióticos y simbióticos.

### **Protocolo de la prueba de extracción de metabolitos de intestinos e hígados de pez blanco.**

- 1- Liofilizar por 24 horas a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  intestino de pez blanco previamente colocado en N líquido y almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 1'- Colocar en N líquido y almacenar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  intestino e hígado de pez blanco (no liofilizar).
- 2- Separar trozos del intestino liofilizado y pesarlos en proporciones (10, 15,15 y 25 mg de peso seco por duplicado).
- 2'- Separar trozos del intestino e hígado almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y pesarlos en proporciones (50 y 70 mg de peso húmedo por duplicado para intestino y 33, 36, 39 y 44 mg de peso húmedo para hígado).
- 3- Colocar trozos de intestino en tubos de homogeneización previamente etiquetados y con cuentas de cerámica (15, 25 y 70 mg X2, 39 y 44mg).
- 3'- Colocar trozos de intestino en tubos de homogeneización previamente etiquetados y sin cuentas de cerámica (10, 15 y 50 mg X2, 33 y 36mg).
- 4- Agregar a los tubos con los trozos de intestino o hígado dentro, 4 mL de metanol frío por cada gramo de muestra húmeda y 1.6 mL de agua HPLC fría por cada gramo de muestra húmeda.
- 5- Colocar los tubos con las muestras y los solventes en un homogeneizador Precellys (precellys.com) a 6,500 rpm por 15 segundos dos veces.
- 6- Sacar los tubos del homogeneizador y agregar 4 mL de cloroformo frío por cada gramo de muestra húmeda y 4 mL de agua HPLC fría por cada gramo de muestra húmeda.
- 7- Agitar los tubos con las muestras y solventes en vortex durante 30 a 60 segundos.
- 8- Inmediatamente colocar los tubos en hielo por 10 minutos (en algunos tubos dio inicio separación de dos fases en este tiempo).
- 9- Centrifugar en  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos a 2,000 g (hubo separación completa de dos fases en todos los tubos).

- 10- Separar las dos fases y colocarlas en dos tubos diferentes y previamente etiquetados con nombre de muestra y fase (arriba o abajo/Up o Down/U o D). (Considerando las dos fases de cada muestra, se sumaron un total de 24 tubos). (Considerando las dos fases de cada muestra de intestino e hígado, se sumaron un total de 32 tubos).
- 11- Colocar los tubos con las fases separadas (10, 15, 15, 25, 36, 39, 50 y 70 mg U y D para cada uno) en un evaporador centrífugo a temperatura ambiente hasta que la fase de cada tubo esté libre de solventes (30 a 150 minutos).
- 11'- Colocar los tubos con las fases separadas (10, 15, 15, 25, 33, 44, 50 y 70 mg U y D para cada uno) en un inyector de Nitrógeno gaseoso hasta que la fase de cada tubo esté libre de solventes (5 a 45 minutos).

### **A2.3 Resultados preliminares de la prueba del análisis de espectros de metabolitos de intestinos e hígados de pez blanco**

De los 32 tubos enviados para determinar el perfil de metabolitos por RMN de las dos fases de las 12 muestras de intestino y 4 de hígado de pez blanco procesadas a partir de la prueba, se ha determinado el perfil de metabolitos de 6 tubos que se enviaron (tubo 3, fase superior resultado del proceso de extracción de metabolitos de un trozo de 15 mg de intestino liofilizado homogeneizado con cuentas de cerámica y secado con nitrógeno gaseoso; tubo 4, fase inferior resultado del proceso de extracción de metabolitos de un trozo de 15 mg de intestino liofilizado homogeneizado con cuentas de cerámica y secado con nitrógeno gaseoso; tubo 19, fase superior resultado del proceso de extracción de metabolitos de un trozo de 15 mg de intestino liofilizado homogeneizado con cuentas de cerámica y secado con evaporador centrífugo; tubo 20, fase inferior resultado del proceso de extracción de metabolitos de un trozo de 15 mg de intestino liofilizado homogeneizado con cuentas de cerámica y secado con evaporador centrífugo; tubo 7, fase superior resultado del proceso de extracción de metabolitos de un trozo de 10 mg de intestino liofilizado homogeneizado sin cuentas de cerámica y secado con nitrógeno gaseoso; tubo 23, fase superior resultado del proceso de extracción de metabolitos de un trozo de 10 mg de intestino liofilizado homogeneizado sin cuentas de cerámica y secado con evaporador centrífugo).

Al analizar detenidamente el perfil de metabolitos de estos tubos, se nota que hay ciertas semejanzas y variaciones en los picos de metabolitos entre las muestras de unos tubos y otros. Los picos de metabolitos de los tubos 3 y 19 son muy parecidos aunque el paso final de secado de solventes fue distinto (tubo 3 se secó con nitrógeno gaseoso y tubo 19 con evaporador centrífugo). Los picos de metabolitos de los tubos 4 y 20 fueron semejantes entre ellos y, a su vez, fueron muy diferentes (menos picos) respecto a los picos de los tubos 3 y 19.

Al observar las características del procesamiento de estos 4 tubos (3, 4, 19 y 20), se nota que los tubos 3 y 4 pertenecen a la misma muestra inicial (intestino de 15 mg liofilizado homogeneizado con cuentas de cerámica y secado con nitrógeno gaseoso) pero en sus dos fases separadas (tubo 3 es fase de arriba y tubo 4 es fase de abajo) resultado del proceso de extracción. También, los tubos 19 y 20 son de una misma muestra (intestino de 15 mg liofilizado homogeneizado con cuentas de cerámica y secado con evaporador centrífugo) con sus dos fases separadas (tubo 19 es fase de arriba y tubo 20 es fase de abajo). Si se analiza en conjunto las características de los picos de estos 4 tubos en cuestión, se nota claramente que los tubos de las fases superiores (U) de las muestras de intestinos resultan con mayor cantidad de picos a comparación de los picos de los tubos de las fases inferiores (D) de dichas muestras. Además, el perfil de metabolitos de los otros dos tubos restantes (tubos 7 y 23) que corresponden a dos muestras distintas (intestino de 10 mg liofilizado homogeneizado sin cuentas de cerámica y secado con nitrógeno gaseoso e intestino de 10 mg liofilizado homogeneizado sin cuentas de cerámica y secado con evaporador centrífugo) resultó que a pesar de que los tubos pertenecían a la fase de arriba de la muestra, el perfil de metabolitos fue menor en el tubo 7 con respecto al tubo 23. Pero, es de considerar que el paso de secado fue distinto en los dos tubos (nitrógeno gaseoso y evaporador centrífugo) por lo que esto pudo haber influido en el resultado de los perfiles de metabolitos en estas muestras.

#### **A2.4 Procesamiento de muestras**

En base al resultado preliminar ya descrito de este experimento de prueba de extracción de metabolitos (aunque tal vez se considere esperar los resultados de las demás muestras que se enviaron para la prueba), se determinó la metodología de

preparación de muestras y análisis de metabolitos de las muestras de componentes intestinales (digesta e intestinos anterior y posterior de los peces blancos recolectados en distintos ambientes de desarrollo (Lago de Pátzcuaro, Cultivo Intensivo y Cultivo Extensivo) y de las muestras de intestino de los peces del experimento de prebióticos y simbióticos. Esta metodología consistirá en aplicar los pasos del protocolo de la prueba de extracción de metabolitos que funcionaron mejor para la determinación del mayor número de picos de metabolitos en las muestras analizadas. Estos pasos son:

- 1- Liofilizar por 24 horas a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y por separado muestra intestinal de pez blanco recolectados en distintos ambientes de desarrollo previamente colocado en N líquido y almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 2- Pesar y separar 15 mg de muestra que resulten de la liofilización.
- 3- Colocar 15 mg de muestra en tubos de homogeneización previamente etiquetados y con cuentas de cerámica.
- 4- Agregar a los tubos con los 15 mg de muestra dentro, 240  $\mu\text{L}$  de metanol frío y 96  $\mu\text{L}$  de agua HPLC fría.
- 5- Colocar los tubos con las muestras y los solventes en un homogeneizador Precellys (precellys.com) a 6,500 rpm por 15 segundos dos veces.
- 6- Sacar los tubos del homogeneizador y agregar 240  $\mu\text{L}$  de cloroformo frío y 240  $\mu\text{L}$  de agua HPLC fría.
- 7- Agitar los tubos con las muestras y solventes en vortex durante 30 a 60 segundos.
- 8- Inmediatamente colocar los tubos en hielo por 10 minutos (puede dar inicio de separación de dos fases en este tiempo en algunos tubos).
- 9- Centrifugar en  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos a 2,000 g (se tienen que separar dos fases en todos los tubos).
- 10- Separar las dos fases y colocarlas en dos tubos diferentes y previamente etiquetados con nombre de muestra y fase (arriba o abajo/Up o Down/U o D).
- 11- Colocar los tubos con las fases de arriba (U) en un evaporador centrífugo a temperatura ambiente hasta que la fase de cada tubo esté libre de solventes (30 a 150 minutos).

**Nota:** En base al peso seco resultante de la liofilización del intestino de la prueba de extracción de metabolitos (~25%), se tomará en consideración para hacer los respectivos cálculos de solventes a agregar para extraer los metabolitos de muestras intestinales de los peces blancos recolectados en distintos ambientes de desarrollo y tratamientos del experimento.

Una vez obtenida las fases de arriba libre de solventes se procederá a llevarlas al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México donde estas fases libres de solventes se rehidratarán con 600  $\mu$ L de buffer de fosfatos (100 mmol/L) disuelto en agua deuterizada ( $D_2O$ ) a pH 7.3 que incluye el compuesto de referencia para NMR tetrametilsilano TMS (Hoffman 2006) a una concentración de 1 mmol/L. Las muestras rehidratadas y homogenizadas se utilizarán para realizar los el análisis de espectroscopia de protones NOESY ( $^1H$ -1D), la espectroscopia correlacionada de protones COSY ( $^1H$ -2D) y la espectroscopia correlacionada cuántica simple heteronuclear HSQC de protones y carbonos ( $^1H$ - $^{13}C$ ) por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN o NMR) para así determinar los metabolitos presentes en las muestras de Digesta e Intestinos Anterior y Posterior de los peces blancos recolectados en el Lago de Pátzcuaro, Cultivo Intensivo y Cultivo Extensivo.

### **A2.5 Análisis del metaboloma por espectroscopia de RMN**

Los estudios de metabolitos por NMR serán realizados en un espectroscopio Bruker de 750 megaHertz (MHz) (ubicado en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México) con ayuda del programa de operación Topspin 1.3 ([www.bruker.com](http://www.bruker.com)). La espectroscopia de protones NOESY en 1 dimensión ( $^1H$ -1D) se realizará con el método noesygppr1d (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) que permite medir la dinámica molecular de los protones incluyendo el efecto de la distancia entre los mismos para investigar la conformación y determinar la proximidad de sistemas de espines adyacentes. Para obtener las líneas del espectro de alta resolución se obtendrán los valores FID (Free Induction Decay) (Hollas 2004), la cual es la señal dependiente del tiempo generada por los espines nucleares magnetizados en desequilibrio (cambio de la orientación del eje de rotación o precesión de Larmor alrededor del campo magnético aplicado) inducida por el pulso resonante de radiofrecuencia electromagnética cercana a la frecuencia

de Larmor de los espines nucleares (Hopf *et al.* 1973). Para mejorar la señal de los picos espectrales sobre el ruido de fondo, se multiplicarán los valores de FID por el exponencial LBF (line broadening factor, que minimiza la amplitud del pico de frecuencia de los protones debida a la interacción entre los espines nucleares y los electrones de otros átomos contiguos) con un valor de 0.3 Hertz ([www.bruker.com](http://www.bruker.com)), para después aplicar a los datos una transformación de Fourier (FT) que básicamente transforma el conjunto de todas las frecuencias de resonancia de los diferentes protones en una sola línea de espectro, con corrección automatizada de la línea base y de la fase de la onda (Schock *et al.* 2013). La identificación de las señales de  $^1\text{H}$  RMN se realizará principalmente utilizando la biblioteca de software ChenomX NMR (ChenomX Inc., Canadá).

### **A2.6 Análisis estadístico**

Para la comparación estadística se utilizará el programa Metaboanalyst 3.0 (Xia *et al.*, 2015) y se realizarán análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) en el programa R (R Core Team, 2013).

### **A2.7 Relación entre la microbiota y los metabolitos**

En orden para entender la relación entre metabolitos y algunos grupos de bacterias (que son parte tanto de la microbiota, así como la core microbiota definida (presente en al menos el 80% de las muestras) que están presentes en las muestras analizadas de ambientes y del experimento de prebióticos y simbióticos, se realizará un análisis de correlación (Análisis de Redundancia (RDA)) y de componentes principales (PCA) en el programa R.

Posterior a este trabajo, se pretende enviar muestras de componentes intestinales (digesta, intestinos anterior y posterior) de ambientes y muestras de intestinos del experimento con la finalidad de determinar las relaciones bacteria-perfil de metabolitos.



### **A3. Procesamiento de muestras para histología**

En el muestreo del experimento de prebióticos y simbióticos también se tomaron muestras de intestino de peces con la finalidad de realizar análisis de cambios en perfil histológico, ya que se ha visto en algunos peces que la adición de suplementos prebióticos, probióticos y simbióticos modulan la morfología del intestino (Barroso *et al.* 2016, Asaduzzaman *et al.* 2018, Sewaka *et al.* 2019, Dawood *et al.* 2020).

Estas muestras se tomaron y se colocaron en solución Davidson por 24 horas. Enseguida, se cambiaron los intestinos a alcohol al 70% hasta dar inicio su proceso histológico. Se enviaron muestras a procesar al CIAD, unidad Mazatlán. Falta analizar (posterior a este trabajo) muestras de cortes histológicos del intestino de los tratamientos (testigo, prebióticos y simbióticos) para definir cambios.

### **A.4. Procesamiento de muestras de hígado derivadas del experimento**

En el muestreo del experimento de prebióticos y simbióticos también se tomaron muestras de hígado de peces con la finalidad de realizar análisis transcriptómico para determinar genes expresados que estén relacionados principalmente con la mejora del crecimiento.

Estas muestras se tomaron y se colocaron en tubos eppendorf nuevos y estériles con solución RNA later. En menos de 8 horas, los tubos con las muestras se almacenaron en ultracongelador a -80 °C hasta su posterior extracción de RNA y procesamiento para secuenciación y análisis (posterior a este trabajo) de los tratamientos (testigo, prebióticos y simbióticos) para definir cambios.

## XI. REFERENCIAS

### XI.1 Referencias Introducción general

- Abu-Elala, N., M. Marzouk y M. Moustafa. 2013. **Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens.** *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 1(1): 21-29. doi:10.1016/j.ijvsm.2013.05.001
- Ayo Olalusi C. I. 2017. **Isolation and Identification of Probiotics *Pediococcus pentosaceus*2 and *Pediococcus pentosaceus*1 from the Gut of *Tilapia Guineensis* for Use in *Aquaculture* Production.** *International Journal of Research Studies in Microbiology and Biotechnology (IJRSMB)* 3: 15-20. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20431/2454-9428.0301004>
- Baldo, L., J. L. Riera, A. Tooming-Klunderud, M. M. Albà y W. Salzburger. 2015. **Gut Microbiota Dynamics during Dietary Shift in Eastern African Cichlid Fishes.** *PLOS ONE* 10(5): 1-23. doi:10.1371/journal.pone.0127462
- Cabello F. C. 2006. **Heavy use of prophylactic antibiotics in *Aquaculture*: a growing problem for human and animal health and for the environment.** *Environmental Microbiology* 8(7): 1137-1144. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
- Cao, H., R. Yu, Y. Zhang, B. Hu, S. Jian, C. Wen, K. Kajbaf, V. Kumar y G. Yang. 2019. **Effects of dietary supplementation with  $\beta$ -glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze).** *Aquaculture* 508: 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2019.04.064>
- Castro, C., A. Pérez-Jiménez, F. Coutinho, P. Pousão-Ferreira, T. M. Brandão, A. Oliva-Teles y H. Peres. 2013. **Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*). Effects of dietary brewer's spent yeast supplementation.** *Aquaculture* 416-417: 322-327. doi:10.1016/j.Aquaculture.2013.09.042

- Cerezuela, R., J. Meseguer y M. A. Esteban. 2011. **Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review.** *Journal of Aquaculture Research Development* 1: 1–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.s1-008>
- Chen K. y L. Pachter. 2005. **Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities.** *PLoS Computational Biology* 1: 0106–0112. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010024>
- CONAPESCA. 2017. **La Acuicultura en México, Retos y Oportunidades.** <https://fiacui.com/2017/Tilapia/Jueves%2028%20sep/Copia%20de%2005%20Situacio%CC%81n%20actual%20de%20la%20acuicultura%20en%20Me%CC%81xico%20COMISIONADO%20MARIO%20AGUILAR%20SANCHEZ%20CONAPESCA.pdf>. (Accesada en febrero de 2022)
- Dawood, M. A. O., N. M. Eweedah, E. M. Moustafa y M. G. Shahin. 2019. **Synbiotic Effects of *Aspergillus oryzae* and  $\beta$ -Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins* doi:10.1007/s12602-018-9513-9
- Dehler, C. E., C. J. Secombes y S. A. M. Martin. 2017. **Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.).** *Aquaculture* 467: 149-157. doi:10.1016/j.Aquaculture.2016.07.017
- do Vale-Pereira, G., D. G. da Cunha, J. L. Pedreira-Mourino, A. Rodiles, A. Jaramillo-Torres y D. L. Merrifiedls. 2017. **Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and isolation of potential probiotic bacteria.** *Journal of Applied Microbiology* 123: 1298-1311 doi:10.1111/jam.13572.
- Egerton, S., S. Culloty, J. Whooley, C. Stanton y R. P. Ross. 2018. **The Gut Microbiota of Marine Fish.** *Frontiers in Microbiology* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00873
- FAO y WHO. 2006. **Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.** Roma, Italia. 50 pp.
- FAO. 2010. **Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation.** Roma, Italia. 166 pp.

- FAO y WHO. 2011. **ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food.** *Indian Journal of Medical Research* 134(1): 22-25.
- FAO. 2016. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016.** Roma, Italia. 190 pp.
- FAO. 2018. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018.** Roma, Italia. 233 pp.
- FAO. 2018. **The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050.** Roma, Italia. 59 pp.
- Fonseca-Madrigal, J., J. C. Navarro, F. Hontoria, D. R. Tocher, C. A. Martínez-Palacios y O. Monroig. 2014. **Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of  $\Delta 4$  and  $\Delta 6\Delta 5$  desaturases of *Chirostoma estor*.** *Journal of Lipid Research* 55: 1408-1419. DOI 10.1194/jlr.M049791
- Gajardo, K., A. Rodiles, T. M. Kortner, Å. Krogh, A. M. Bakke, D. L. Merrifield y H. Sørum. 2016. **A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research.** *Scientific Reports* 6: 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep30893>
- Ghaedi, G., S. Keyvanshokoo, H. Mohammadi Azarm y M. Akhlaghi. 2015. **Effects of dietary  $\beta$ -glucan on maternal immunity and fry quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Aquaculture* 441: 78–83. doi:10.1016/j.Aquaculture.2015.02.023
- Ghanbari, M., W. Kneifel y K. J. Domig. 2015. **A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing.** *Aquaculture* 448: 464-475. doi:10.1016/j.Aquaculture.2015.06.033
- Ghanei-Motlagh, R., T. Mohammadian, D. Gharibi, M. Khosravi, E. Mahmoudi, M. Zarea, M. El-Matbouli y S. Menanteau-Ledouble. 2020. **Quorum quenching probiotics modulated digestive enzymes activity, growth performance, gut microflora, haemato-biochemical parameters and resistance against *Vibrio harveyi* in Asian seabass (*Lates calcarifer*).** *Aquaculture* 735874. doi:10.1016/j.Aquaculture.2020.735874

- Gibson, G. R., R. Hutkins, M. E. Sanders, S. L. Prescott, R. A. Reimer, S. J. Salminen, K. Scott, C. Stanton, K. S. Swanson, P. D. Cani, K. Verbeke y G. Reid. 2017. **Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics.** *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 14: 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gómez-Gil, B., K. Enciso-ibarra, E. Cruz-Suárez, C. Hernández, E. Osuna-García, M. Nieto-López y C. Montero-Lizárraga. 2017. **Efecto de la Dieta en el Microbioma Intestinal de Organismos Acuáticos.** En: Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Nieto-López, D. A. Villarreal-Cavazos, J. Gamboa-Delgado, L. M. López Acuña y M. Galaviz-Espinoza (Eds.). **Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuicola.** Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. pp. 570-581.
- Guangxin, G., K. Li, Q. Zhu, C. Zhao, C. Li, Z. He, S. Hu y Y. Ren. 2022. **Improvements of immune genes and intestinal microbiota composition of turbot (*Scophthalmus maximus*) with dietary oregano oil and probiotics.** *Aquaculture* 547: 737442. doi:10.1016/j.Aquaculture.2021.737442
- Guerreiro, I., A. Oliva-Teles y P. Enes. 2017. **Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish Aquaculture.** *Reviews in Aquaculture* 10: 800-832. doi:10.1111/raq.12201
- Hahor, W., K. Thongprajukaew y N. Suanyuk. 2019. **Effects of dietary supplementation of oligosaccharides on growth performance, gut health and immune response of hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*).** *Aquaculture* doi:10.1016/j.Aquaculture.2019.04.010
- Hasan, M.T., W. J. Jang, H. Kim, B.-J. Lee, K. W. Kim, S. W. Hur, S. G. Lim, S. C. Bai y I. S. Kong. 2018. **Synergistic effects of dietary *Bacillus* sp. SJ-10 plus  $\beta$ -glucopoligosaccharides as a synbiotic on growth performance, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys***

- olivaceus**). *Fish & Shellfish Immunology* 82: 544-553.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.002>
- Hoseinifar, S. H., A. Mirvaghefi y D. L. Merrifield. 2011. **The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*).** *Aquaculture* 318: 90-94.  
[doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.043](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.043)
- Horgan, R. P., y L. C. Kenny. 2011. **SAC review 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics.** *The Obstetrician & Gynaecologist* 13: 189-195.  
<https://doi.org/10.1576/toag.13.3.189.27672>
- Hussein, M. M. A., W. H. Hassan y M. A. Mahoud. 2013. **Pathogenicity of *Achlya proliferoides* and *Saprolegnia diclina* (Saprolegniaceae) Associated with Saprolegniosis Outbreaks in Cultured Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *World Journal of Fish and Marine Sciences* 5(2): 188-193. DOI: 10.5829/idosi.wjfds.2013.05.02.7212
- INAPESCA. 2013. **Avances en el cultivo de pescado blanco.** Ediciones de la Noche. Guadalajara, Jalisco, México. 80 pp.
- Kong, Y., C. Gao, X. Du, J. Zhao, M. Li, X. Shan y G. Wang. 2020. **Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead fish (*Channa argus*).** *Fish & Shellfish Immunology* 102: 412-421.  
[doi:10.1016/j.fsi.2020.05.003](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.003)
- Kurath G. y J. Winton. 2011. **Complex dynamics at the interface between wild and domestic viruses of finfish.** *Current Opinion in Virology* 1(1): 73-80. [doi:10.1016/j.coviro.2011.05.010](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.05.010)
- Mahious, A. S., F. J. Gatesoupe, M. Hervi, R. Metailler y F. Ollevier. 2006. **Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758).** *Aquaculture International* 14: 219-229.  
<https://doi.org/10.1007/s10499-005-9003-4>

- Martínez-Chávez, C. C., P. Navarrete-Ramírez, L. Raggi, M. G. Ríos-Duran, J. Fonseca-Madrigal, M. C. Chávez-Sánchez, J. M. Amillano-Cisneros y C. A. Martínez-Palacios. 2022. **Retos y perspectivas del sector acuícola rumbo al 2050.** *Ciencia Nicolaita* 83: 153-182. DOI: <https://doi.org/10.35830/cn.vi83.572>
- Martínez-Palacios, C. A., M. C. Aguilar-Valdez, C. A. Strüssmann, M. G. Ríos-Durán, E. M. Toledo-Cuevas, P. Navarrete-Ramírez, J. Fonseca-Madrigal, C. C. Martínez-Chávez Y L. G. Ross. 2019. **The orobranchial structures in four neotropical silversides (Teleostei: Atherinopsidae) related with feeding habits.** *Zoomorphology* 138(1): 511-523. <https://doi.org/10.1007/s00435-019-00457-1>.
- Martínez-Palacios, C. A., M. Toledo-Cuevas, E. Racotta Dimitrov, M. G. Ríos-Durán, E. Palacios-Metchenov, J. Fonseca-Madrigal, A. Campos-Mendoza y L. G. Ross. 2006. **Aspectos nutricionales del pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor* Jordan, 1879).** Memorias del Octavo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México. pp. 524-544.
- Martínez-Chávez, C., P. Navarrete-Ramírez, L. Raggi, C. Strussmann, J. P. Hualde, M. A. Demicheli y J. Fonseca-Madrigal. 2020. **High levels of docosahexaenoic acid are present in eight New World silversides (Pisces: Atherinopsidae).** *Neotropical Ichthyology* 18: 1-11 <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2019-0089>.
- Mennerat, A., F. Nilsen, D. Ebert y A. Skorping. 2010. **Intensive Farming: Evolutionary Implications for Parasites and Pathogens.** *Evolutionary Biology* 37: 59-67. doi:10.1007/s11692-010-9089-0
- Miyake, S., D. K. Ngugi y U. Stingl. 2015. **Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes.** *Molecular Ecology* 24: 656-672. <https://doi.org/10.1111/mec.13050>
- Mohammadian, T., M. Alishahi, M. R. Tabandeh, M. Ghorbanpoor y D. Gharibi. 2017. **Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on growth performance, gut microbial flora and digestive**

- enzymes activities in *Tor grypus* (Karaman, 1971).** *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 16: 296-317.
- Morais, S., G. Mourente, A. Martínez, N. Gras y D. R. Tocher. 2015. **Docosahexaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and  $\Delta 4$ -desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1851 (5): 588-597. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2015.01.014>
- Murray A.G. y E.J. Peeler. 2005. **A framework for understanding the potential for emerging diseases in *Aquaculture*.** *Preventive Veterinary Medicine* 67(2-3): 223-235.
- Nayak S.K. 2010. **Role of gastrointestinal microbiota in fish.** *Aquaculture Research* 41: 1553-1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Oliveira, F., R. Y. D. Kasai, C. E. Fernandes, W. Souza y C. M. de Campos. 2020. **Probiotic, prebiotic and synbiotics supplementation on growth performance and intestinal histomorphometry *Pseudoplatystoma reticulatum* larvae.** *Journal of Applied Aquaculture* 1-15. doi:10.1080/10454438.2020.1841060
- Rahimnejad, S., F.A. Guardiola, E. Leclercq, M.A. Esteban, M. Castex, E. Sotoudeh y S.-M. Lee. 2018. **Effects of dietary supplementation with *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, galactooligosaccharide and their synbiotic on growth, innate immunity and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegelii*).** *Aquaculture* 482: 36-44. doi: 10.1016/j.Aquaculture.2017.09.020
- Rimoldi, S., E. Gini, F. Iannini, L. Gasco y G. Terova. 2019. **The effects of dietary insect meal from *Hermetia illucens* prepupae on autochthonous gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Animals* 9: 1-17. <https://doi.org/10.3390/ani9040143>
- Ringø, E., R. E. Olsen, T. Gifstad, R. A. Dalmo, H. Amlund, G. I. Hemre y A. M. Bakke. 2010. **Prebiotics in *Aquaculture*: A review.** *Aquaculture Nutrition* 16: 117-136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
- Ringø, E., Z. Zhou, J. L. G. Vecino, S. Wadsworth, J. Romero, Å. Krogdahl, R. E. Olsen, A. Dimitroglou, A. Foey, S. Davies, M. Owen, H. L. Lauzon, L.L.



- Martinsen, P. De Schryver, P. Bossier, S. Sperstad y D. L. Merrifield. 2016. **Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?** *Aquaculture Nutrition* 22: 219-282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Rivera-Espinoza Y. y Y. Gallardo-Navarro. 2010. **Non-dairy probiotic products.** *Food Microbiology* 27: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.008>
- Robertson, P., C. O'dowd, C. Burrells, P. Williams y B. Austin. 2000. **Use of Carnobacterium sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum).** *Aquaculture* 185:235-243.
- Roeselers, G., E. K. Mittge, W. Z. Stephens, D. M. Parichy, C.M. Cavanaugh, K. Guillemin, J. F. Rawls. 2011. **Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish.** *The ISME Journal* 5: 1595-1608. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38>
- Ross, L.G., C. A. Martínez-Palacios, M. C. Aguilar-Valdez, M. C. M. Beveridge y M.C. Chávez-Sánchez. 2006. **Determination of feeding mode in fishes: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chiostoma estor estor* Jordan 1880.** *Journal of Fish Biology* 68: 1782-1794 [doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01061.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01061.x).
- Standen, B. T., M. D. Rawling, S. J. Davies, M. Castex, A. Foey, G. Gioacchini, O. Carnevali y D. L. Merrifield. 2013. **Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Fish & Shellfish Immunology* 35: 1097-1104. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.018>
- Sundberg, L.-R., T. Ketola, E. Laanto, H. Kinnula, J. K. H. Bamford. R. Penttinen y J. Mappes. 2016. **Intensive Aquaculture selects for increased virulence and interference competition in bacteria.** *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283: 20153069. [doi:10.1098/rspb.2015.3069](https://doi.org/10.1098/rspb.2015.3069)

- Sweet M. J. y M. T. Bulling. 2017. **On the Importance of the Microbiome and Pathobiome in Coral Health and Disease.** *Frontiers in Marine Science* 4(9): 1-11 doi:10.3389/fmars.2017.00009
- Tacon, A. G. J. y M. Metian. 2013. **Fish Matters : Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global Food Supply.** *Reviews in Fisheries Science* 21(1): 22-38. DOI: 10.1080/10641262.2012.753405
- Tavares-Dias M. y M. L. Martins. 2017. **An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms.** *Journal of Parasitic Diseases* 41(4): 913-919.
- Tiengtam, N., S. Khempaka, P. Paengkoum y S. Boonanuntanasarn. 2015. **Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Animal Feed Science and Technology* 207: 120-129. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.05.008
- Torrecillas, S., A. Makol, M. J. Caballero, D. Montero, L. Robaina, F. Real, J. Sweetman, L. Tort y M. S. Izquierdo. 2007. **Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides.** *Fish & Shellfish Immunology* 23(5): 969-981. doi:10.1016/j.fsi.2007.03.007
- Tremaroli V. y F. Bäckhed. 2012. **Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism.** *Nature* 489: 242-249. <https://doi.org/10.1038/nature11552>
- Van den Berg, A. H., D. McLaggan, J. Diéguez-Uribeondo y P. van West. 2013. **The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the Aquaculture industry.** *Fungal Biology Reviews* 27(2): 33-42. doi:10.1016/j.fbr.2013.05.001
- Vetvicka, V., L. Vannucci y P. Sima. 2013. **The effects of  $\beta$  - glucan on fish immunity.** *North American Journal of Medical Sciences* 5(10): 580. doi:10.4103/1947-2714.120792
- Vinderola, C. G. y J. A. Reinheimer. 2003. **Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and**

- biological barrier resistance.** *Food Research International* 36: 895-904.  
[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)
- Zhang, P., F. Yang, J. Hu, D. Han, H. Liu, J. Jin, Y. Yang, J. Yi, X. Zhu, S. Xie. 2020. **Optimal form of yeast cell wall promotes growth, immunity and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*).** *Aquaculture Reports* 18: 100465. doi:10.1016/j.aqrep.2020.100465
- Zhou, Q. C., J. A. Buentello y D. M. Gatlin. 2010. **Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*).** *Aquaculture* 309: 253-257.  
<https://doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2010.09.003>

### XI.2 Referencias Estrategia metodológica

- AOAC, 2000. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 17a. ed. Washington DC, USA. 1018 pp.
- Douglas, G. M., V. J. Maffei, J. Zaneveld, S. N. Yurgel, J. R. Brown, C. M. Taylor, C. Huttenhower y M. G. I. Langille. 2019. **PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference.** *bioRxiv* 672295. doi: <https://doi.org/10.1101/672295>.
- Doyle J. J. y J. L. Doyle. 1987. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemical Bulletin* 19(1): 11-15.

### XI.3 Referencias Discusión general

- Abarike, E. D., J. Cai, Y. Lu, H. Yu, L. Chen, J. Jian, J. Tang, L. Jun y F. K. A. Kuebutornye. 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. doi:10.1016/j.fsi.2018.08.037
- Abd El-Rhman, A. M., Y. A. E. Khattab y A. M. E. Shalaby. 2009. ***Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *Fish & Shellfish Immunology* 27: 175-180. doi:10.1016/j.fsi.2009.03.020.

- Ahmed I. y M. A. Khan. 2006. **Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton).** *British Journal of Nutrition* 96: 450-460. DOI: 10.1079/BJN20061845
- Akrami, R., Y. Iri, H. Khoshbavar Rostami y M. Razeghi Mansour. 2013. **Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, *Lactobacillus* bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile.** *Fish & Shellfish Immunology* 35(4): 1235-1239. doi:10.1016/j.fsi.2013.07.039
- Akter, M. N., R. Hashim, A. Sutriana, M. N. Siti Azizah y M. Asaduzzaman. 2019. **Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performances, digestive enzyme activities and gut histomorphology of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878) juveniles.** *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.1393
- Alonso, S., M. C. Castro, M. Berdasco, I. G. de la Banda, X. Moreno-Ventas y A. H. de Rojas. 2018. **Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. doi:10.1007/s12602-018-9439-2
- Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi y D. R. W. Griffith. 1995. **A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*.** *Journal of Fish Diseases* 18:93-96.
- Baesi, F., A. Aberoumand, S. Ziaei Nejad y M. Javaheri Baboli. 2017. **Effect of commercial probiotic *Lactobacillus* on fatty acids profile and nutritional value of *Cyprinus carpio* in Iran.** *Carpathian Journal of Food Science Technology* 9(4): 189-196.
- Behera, B. K., P. Paria, A. Das, S. Bhowmick, A. K. Sahoo y B. K. Das. 2017. **Molecular characterization and pathogenicity of a virulent *Acinetobacter baumannii* associated with mortality of farmed Indian Major Carp *Labeo***

- rohita (Hamilton 1822).** *Aquaculture* 471: 157-162.  
doi:10.1016/j.Aquaculture.2017.01.018
- Bringel F. y J.-C. Hubert. 2003. **Extent of Genetic Lesions of the Arginine and Pyrimidine Biosynthetic Pathways in *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, and *L. casei*: Prevalence of CO<sub>2</sub>-Dependent Auxotrophs and Characterization of Deficient *arg* Genes in *L. plantarum*.** *Applied and Environmental Microbiology* 69(5): 2674-2683. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2674–2683.2003
- Brunt J. y B. Austin. 2005. **Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** *Journal of Fish Diseases* 28: 693-701.
- Cerezuela, R., M. Fumanal, S. T. Tapia-Paniagua, J. Meseguer, M. Á. Moriñigo, M.Á. Esteban. 2013. **Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens.** *Fish & Shellfish Immunology* 34(5): 1063-1070. doi:10.1016/j.fsi.2013.01.015
- Cisak, E., A. Wójcik-Fatla, V. Zając, A. Sawczyn, J. Sroka y J. Dutkiewicz. 2015. ***Spiroplasma* – an emerging arthropod-borne pathogen?** *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 22(4): 589-593. doi: 10.5604/12321966.1185758
- Costa, F., C. Leal, N. Schuenker, R. Leite y Figueiredo. 2015. **Characterization of *Weissella ceti* infections in Brazilian rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farms and development of an oil-adjuvanted vaccine.** *Journal of Fish Diseases* 38: 295-302. <https://doi.org/10.1111/jfd.12236>
- Dai, Z.-L., G. Wu y W.-Y. Zhu. 2011. **Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health.** *Frontiers in Bioscience* 16(1): 1768. doi:10.2741/3820
- Dehler, C. E., C. J. Secombes, S.A.M. Martin. 2017. **Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.).** *Aquaculture* 467: 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2016.07.017>

- Ding, Z. F., S. Y. Xia, H. Xue, J. Q. Tang, Q. Ren, W. Gu, Q. G. Meng y W. Wang. 2014. **Direct visualization of the novel pathogen, *Spiroplasma eriocheiris*, in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) using fluorescence *in situ* hybridization.** *Journal of Fish Diseases* 38(9): 787-794. doi:10.1111/jfd.12287
- do Vale-Pereira, G., D. G. da Cunha, J. L. Pedreira-Mourino, A. Rodiles, A. Jaramillo-Torres y D. L. Merrifiedls. 2017. **Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and isolation of potential probiotic bacteria.** *Journal of Applied Microbiology* 123: 1298-1311 doi:10.1111/jam.13572.
- Dong, M., L. Feng, S.-Y. Kuang, Y. Liu, J. Jiang, K. Hu, W.-D. Jiang, S.-H. Li, L. Tang y X.-Q. Zhou. 2013. **Growth, body composition, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of dietary valine.** *Aquaculture Nutrition* 19(1): 1-14. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00926.x
- Douglas, G. M., V. J. Maffei, J. Zaneveld, S. N. Yurgel, J. R. Brown, C. M. Taylor, C. Huttenhower y M. G. I. Langille. 2019. **PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference.** *bioRxiv* 672295. doi: <https://doi.org/10.1101/672295>.
- Egerton, S., S. Culloty, J. Whooley, C. Stanton y R. P. Ross. 2018. **The Gut Microbiota of Marine Fish.** *Frontiers in Microbiology* 9: 873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- Estante-Superio, E. G., R. V. Pakingking, V. L. Corre y E. R. Cruz-Lacierda. 2020. ***Vibrio harveyi*-like bacteria associated with fin rot in farmed milkfish *Chanos chanos* (Forsskal) fingerlings in the Philippines.** *Aquaculture* 736259. doi:10.1016/j.Aquaculture.2020.736259
- Falcinelli, S., A. Rodiles, S. Unniappan, S. Picchietti, G. Gioacchini, D. L. Merrifield y O. Carnevali. 2016. **Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model.** *Scientific Reports* 6: 18061. doi:10.1038/srep18061
- FAO. 2018. **The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050.** Roma, Italia. 59 pp.

- Feng, C., Sarigaiqiqige, W. Liu, H. Chen, W. Dong y J. Yang. 2021. **Effect of dark environment on intestinal flora and expression of genes related to liver metabolism in zebrafish (*Danio rerio*)**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology* 249: 109100. doi:10.1016/j.cbpc.2021.109100
- Figueiredo, H., F. Costa, C. Leal, G. Carvalho-Castro y R. Leite. 2012. **Weissella sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil**. *Veterinary Microbiology* 156: 359-366. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.008>
- Fonseca-Madrigal, J., J. C. Navarro, F. Hontoria, D. R. Tocher, C. A. Martínez-Palacios y O. Monroig. 2014. **Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of  $\Delta 4$  and  $\Delta 6\Delta 5$  desaturases of *Chirostoma estor***. *Journal of Lipid Research* 55: 1408-1419. DOI 10.1194/jlr.M049791
- Gajardo, K., A. Rodiles, T. M. Kortner, Å. Kroghdahl, A. M. Bakke, D. L. Merrifield y H. Sørum. 2016. **A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research**. *Scientific Reports* 6: 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep30893>
- Gan, L., W.-D Jiang, P. Wu, Y. Liu, J. Jiang, S.-H. Li, S.-Y. Kuang, L. Feng y X.-Q. Zhou. 2014. **Flesh Quality Loss in Response to Dietary Isoleucine Deficiency and Excess in Fish: A Link to Impaired Nrf2-Dependent Antioxidant Defense in Muscle**. *PLoS ONE* 9(12): e115129. doi:10.1371/journal.pone.0115129
- Geng, X., X.-H. Dong, B.-P. Tan, Q.-H. Yang, S.-Y. Chi, H.-Y. Liu y X.-Q. Liu. 2011. **Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum***. *Fish & Shellfish Immunology* 31(3): 400-406. doi:10.1016/j.fsi.2011.06.006
- Geraylou, Z., C. Souffreau, E. Rurangwa, S. D'Hondt, L. Callewaert, C. M. Courtin, J. A. Delcour, J. Buyse y F. Ollevier. 2012. **Effects of arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser***

- baerii) performance, immune responses and gastrointestinal microbial community.** *Fish & Shellfish Immunology* 33: 718-724. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.010>
- Gerth, M., H. Martinez-Montoya, P. Ramirez, F. Masson, J. S. Griffin, R. Aramayo, S. Siozios, B. Lemaitre, M. Mateos y G. D. D. Hurst. 2021. **Rapid molecular evolution of *Spiroplasma* symbionts of *Drosophila*.** *Microbial Genomics* 7: 000503. DOI 10.1099/mgen.0.000503
- Givens, C., B. Ransom, N. Bano y J. Hollibaugh. 2015. **Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species.** *Marine Ecology Progress Series* 518: 209-223. <https://doi.org/10.3354/meps11034>
- Goh H. F. y K. Philip. 2015. **Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin.** *PLoS One* 10: e0140434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140434>
- Gómez-Duarte O. G. 2014. **Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia.** *Revista Chilena de Infectología* 31(5): 577-586. doi:10.4067/s0716-10182014000500010
- González-Félix, M.L., D. M. Gatlin, P. Urquidez-Bejarano, C. de la Reé-Rodríguez, L. Duarte-rodríguez, F. Sánchez, A. Casas-reyes, F. Y. Yamamoto, A. Ochoa-Leyva y M. Pérez-Velázquez. 2018. **Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*.** *Aquaculture* 491: 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2018.03.031>
- Guangxin, G., K. Li, Q. Zhu, C. Zhao, C. Li, Z. He, S. Hu y Y. Ren. 2022. **Improvements of immune genes and intestinal microbiota composition of turbot (*Scophthalmus maximus*) with dietary oregano oil and probiotics.** *Aquaculture* 547: 737442. doi:10.1016/j.Aquaculture.2021.737442
- Guardiola-Álvarez, K. A., M. C. Monroy-Dosta, M. Rodríguez-Gutiérrez y M. T. Núñez-Cardona. 2016. **Biological control of *Aeromonas salmonicida* in *Puntius conchoni* culture using probiotics under laboratory and fish farm conditions.** *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 4(4): 440-443.



- Gunasekara, R. A. Y. S. A., A. Rekecki, K. Baruah, P. Bossier y W. Van den Broeck. 2010. **Evaluation of probiotic effect of *Aeromonas hydrophila* on the development of the digestive tract of germ-free *Artemia franciscana* nauplii.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 393(1-2): 78-82. doi:10.1016/j.jembe.2010.07.006
- Hagi, T., D. Tanaka, Y. Iwamura y T. Hoshino. 2004. **Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish.** *Aquaculture* 234(1-4): 335-346. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.01.018
- Hao, P, H. Zheng, Y. Yu, G. Ding, W. Gu, S. Chen, Z. Yu, S. Ren, M. Oda, T. Konno, S. Wang, X. Li, Z.-S. Ji y G. Zhao. 2011. **Complete Sequencing and Pan-Genomic Analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Reveal Its Genetic Basis for Industrial Yogurt Production.** *PLoS ONE* 6(1): e15964. doi:10.1371/journal.pone.0015964
- Hasan, M. T., W. J. Jang, H. Kim, B.-J. Lee, K. W., Kim, S. W. Hur, S. G. Lim, S.C. Bai y I.-S. Kong. 2018. **Synergistic effects of dietary *Bacillus* sp. SJ-10 plus  $\beta$ -glucooligosaccharides as a synbiotic on growth performance, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).** *Fish & Shellfish Immunology* 82: 544-553. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.002>
- Hashemimofrad, M., M. Sattari, M. Khoshkholgh, A. Shenavar Masuoleh y A. Abasalizadeh. 2016. **Effect of *Weissella cibaria* as probiotic on some on growth factors in Siberian sturgeon *Acipenser baerii*.** *AquaDocs* 11. <http://hdl.handle.net/1834/10872>
- He, L.-S., P.-W. Zhang, J.-M. Huang, F.-C. Zhu, A. Danchin y Y. Wang. 2018. **The enigmatic genome of an obligate ancient *Spiroplasma* symbiont in a hadal holothurian.** *Applied and Environmental Microbiology* 84: e01965-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01965-17>.
- Hennersdorf, P., G. Mrotzek, M. A. Abdul-Aziz y H. P. Saluz. 2016. **Metagenomic analysis between free-living and cultured *Epinephelus fuscoguttatus* under different environmental conditions in Indonesian waters.** *Marine*

- Pollution Bulletin* 110: 726-734.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.009>
- Hoseinifar, S.H., M.Á. Esteban, A. Cuesta y Y.-Z. Sun. 2015. **Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives.** *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 23(4): 315-328. doi:10.1080/23308249.2015.1052365
- Hoseinifar, S. H., M. Khalili, H. Khoshbavar Rostami y M. Á. Esteban. 2013. **Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry.** *Fish & Shellfish Immunology* 35(5): 1416-1420. doi:10.1016/j.fsi.2013.08.007
- Hoseinifar, S. H., S. Yousefi, H. Van Doan, G. Ashouri, G. Gioacchini, F. Maradonna y O. Carnevali. 2020. **Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics.** *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 1–20. doi:10.1080/23308249.2020.1795616
- Hu, M., Y. Wang, Q. Wang, M. Zhao, B. Xiong, X. Qian, Y. Zhao y L. Luo. 2008. **Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients with lysine and methionine supplementation to practical diets for gibel carp, *Carassius auratus gibelio*.** *Aquaculture* 275(1-4): 260-265. doi:10.1016/j.Aquaculture.2008.01.005
- Huang, Z., X.-h. Tan, C.-p. Zhou, Y.-k. Yang, C.-l. Qi, S.-y. Zhao y H.-z. Lin. 2018. **Effect of dietary valine levels on the growth performance, feed utilization and immune function of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*.** *Aquaculture Nutrition* 24(1): 74-82. DOI: 10.1111/anu.12535
- Huebner, C., Y. Ding, I. Petermann, C. Knapp y L. R. Ferguson. 2011. **The Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Reduces Pathogen Invasion and Modulates Cytokine Expression in Caco-2 Cells Infected with Crohn's Disease-Associated *E. coli* LF82.** *Applied and Environmental Microbiology* 77(7): 2541-2544. doi:10.1128/aem.01601-10
- Jiang, H., T. Chen, H. Sun, Z. Tang, J. Yu, Z. Lin, P. Ren X. Zhou Y. Huang X. Li y X. Yu. 2017. **Immune response induced by oral delivery of *Bacillus subtilis* spores expressing enolase of *Clonorchis sinensis* in grass carps**

- (*Ctenopharyngodon idellus*)**. *Fish & Shellfish Immunology* 60: 318-325. doi:10.1016/j.fsi.2016.10.011
- Jiang, Y., X. Liu, Y. Xu, B. Shi y B. Wang. 2019. **Microbiota characteristics in *Sebastes schlegelii* intestine in early life stages**. *Journal of Oceanology and Limnology*. doi:10.1007/s00343-019-9011-2
- Jiang, Y., Z. Liu, X. Liu, Y. Xu, B. Shi y B. Wang. 2018. **Structural characteristics and succession of intestinal microbiota for *Paralichthys olivaceus* during the early life stage**. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.13924
- Kahyani, F., E. Pirali - Kheirabadi, S. Shafiei y A. Shenavar Masouleh. 2021. **Effect of dietary supplementation of potential probiotic *Weissella confusa* on innate immunity, immune - related genes expression, intestinal microbiota and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Aquaculture Nutrition* 27(5): 1411-1420. doi:10.1111/anu.13279
- Khan M.A. y S. F. Abidi. 2007. **Dietary isoleucine requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton)**. *Aquaculture Nutrition* 13: 424-430.
- Khodadad, C. L. M., M. E. Hummerick, L. E. Spencer, A. R. Dixit, J. T. Richards, M. W. Romeyn, T. M. Smith, R.M. Wheeler y G. D. Massa. 2020. **Microbiological and Nutritional Analysis of Lettuce Crops Grown on the International Space Station**. *Frontiers in Plant Science* 11. doi:10.3389/fpls.2020.00199
- King, C.E. y G. M. King. 2014. **Description of *Thermogemmatispora carboxidivorans* sp. nov., a carbon-monoxide-oxidizing member of the class Ktedonobacteria isolated from a geothermally heated biofilm, and analysis of carbon monoxide oxidation by members of the class Ktedonobacteria**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 1244-1251. doi: 10.1099/ijs.0.059675-0
- Korkea-aho, T.L., A. Papadopoulou, J. Heikkinen, A. Von Wright, A. Adams y B. Austin. 2012. ***Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity**. *Journal of Applied Microbiology* 113: 24-35. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05325.x.<b

- Lee, S., K. Katya, A. Hamidoghli, J. Hong, D.-J. Kim y S. C. Bai. 2018. **Synergistic effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* WB60 and mannanoligosaccharide (MOS) on growth performance, immunity and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*.** *Fish & Shellfish Immunology* 83: 283-291. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.031>
- Li, T., M. Long, H. Li, F. J. Gatesoupe, X. Zhang, Q. Zhang, D. Feng y A. Li. 2017. **Multi-omics analysis reveals a correlation between the host phylogeny, gut microbiota and metabolite profiles in cyprinid fishes.** *Frontiers in Microbiology* 8: 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2017.00454.
- Lim, J. Y., J. W. Yoon y C. J. Hovde. 2010. **A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157.** *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(1): 5-14.
- Lin, G., M. Zheng, S. Li, J. Xie, W. Fang, D. Gao, J. Huang y J. Lu. 2020. **Response of gut microbiota and immune function to hypoosmotic stress in the yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*).** *Science of the Total Environment* 745: 140976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140976>
- Lin, M., C. Zeng, X. Jia, S. Zhai, Z. Li y Y. Ma. 2018. **The composition and structure of the intestinal microflora of *Anguilla marmorata* at different growth rates: a deep sequencing study.** *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.14174
- Liu, J. Y., A. H. Li, C. Ji y W. M. Yang. 2009. **First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China.** *Veterinary Microbiology* 136: 314-320. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.027>
- Lü, A., X. Hu, L. Zheng, A. Zhu, C. Cao y J. Jiang. 2011. **Isolation and characterization of *Citrobacter* spp. from the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*.** *Aquaculture* 313(1-4): 156-160. doi:10.1016/j.Aquaculture.2011.01.018
- Mahious, A. S., F. J. Gatesoupe, M. Hervi, R. Metailler y F. Ollevier. 2006. **Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot,**

- Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758).** *Aquaculture International* 14: 219-229.  
<https://doi.org/10.1007/s10499-005-9003-4>
- Martínez-Palacios, C. A., M. C. Aguilar-Valdez, C. A. Strüssmann, M. G. Ríos-Durán, E. M. Toledo-Cuevas, P. Navarrete-Ramírez, J. Fonseca-Madrugal, C. C. Martínez-Chávez y L. G. Ross. 2019. **The orobranchial structures in four neotropical silversides (Teleostei: Atherinopsidae) related with feeding habits.** *Zoomorphology* 138(1): 511-523. <https://doi.org/10.1007/s00435-019-00457-1>.
- Martínez-Palacios, C. A., S. Concha-Santos, E. M. Toledo-Cuevas, M. G. Ríos-Durán, C. C. Martínez-Chávez, P. Navarrete-Ramírez, L. Raggi, C. Strussmann, J. P. Hualde, M. A. Demicheli y J. Fonseca-Madrugal. 2020. **High levels of docosahexaenoic acid are present in eight New World silversides (Pisces: Atherinopsidae).** *Neotropical Ichthyology* 18: 1-11. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2019-0089>.
- Martínez-Palacios, C. A., M. G. Ríos-Durán, L. Ambriz-Cervantes, K. J. Jauncey y L. G. Ross. 2007. **Dietary protein requirement of juvenile Mexican Silverside (*Menidia estor* Jordan 1879), a stomachless zooplanktophagous fish.** *Aquaculture Nutrition* 13: 304-310.
- Masuda, Y., T. Zendo, N. Sawa, R. H. Perez, J. Nakayama y K. Sonomoto. 2011. **Characterization and identification of weissellicin Y and weissellicin M, novel bacteriocins produced by *Weissella hellenica* QU 13.** *Journal of Applied Microbiology* 112(1): 99-108. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05180.x
- Merrifield, D. L., J. L. Balcázar, C. Daniels, Z. Zhou, O. Carnevali, Y.-Z. Sun, S. H. Hoseinifar y E. Ringø. 2014. **Indigenous Lactic Acid Bacteria in Fish and Crustaceans.** *Aquaculture Nutrition* 128-168. doi:10.1002/9781118897263.ch6
- Merrifield, D.L., A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. M. Baker, J. Bøgwald, M. Castex y E. Ringø. 2010. **The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids.** *Aquaculture* 302: 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2010.02.007>

- Momeni-Moghaddam, P., S. Keyvanshokoo, S. Ziaei-Nejad, A. Parviz Salati y H. Pasha-Zanoosi. 2015. **Effects of mannan oligosaccharide supplementation on growth, some immune responses and gut lactic acid bacteria of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings.** *Veterinary Research Forum* 6 (3): 239-244.
- Morais, S. G., A. Mourente, A. Ortega, J. A., Tocher y D. R. Tocher. 2011. **Expression of fatty acyl desaturase and elongase genes, and evolution of DHA: EPA ratio during development of unfed larvae of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.).** *Aquaculture* 313: 129-139. doi:10.1016/j.Aquaculture.2011.01.031
- Morais, S., G. Mourente, A. Martínez, N. Gras y D. R. Tocher. 2015. **Docosahexaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and  $\Delta 4$ -desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1851 (5): 588-597. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2015.01.014>
- Mouriño, J. L. P., F. do Nascimento Vieira, A. B. Jatobá, B. C. da Silva, G. F. A. Jesus, W. Q. Seiffert y M. L. Martins. 2012. **Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp).** *Aquaculture Nutrition* 18: 73-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00879.x>
- Mussatto S. I. I. M. Mancilha. 2007. **Non-digestible oligosaccharides: A review.** *Carbohydrate Polymers* 68(3): 587-597. doi:10.1016/j.carbpol.2006.12.011
- Neis, E., C. Dejong y S. Rensen. 2015. **The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism.** *Nutrients* 7(4): 2930-2946. doi:10.3390/nu7042930
- Nikouli, E., A. Meziti, E. Antonopoulou, E. Mente y K. Kormas. 2018. **Gut Bacterial Communities in Geographically Distant Populations of Farmed Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*).** *Microorganisms* 6(3): 92. doi:10.3390/microorganisms6030092
- Nunan, L.M., D. V. Lightner, M. A. Oduori y G. E. Gasparich. 2005. *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific

- white shrimp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(6): 2317-2322. doi:10.1099/ijms.0.63555-0
- Park, J. y E. B. Kim. 2021. **Insights into the Gut and Skin Microbiome of Freshwater Fish, Smelt (*Hypomesus nipponensis*)**. *Current Microbiology* 78(5): 1798-1806. doi:10.1007/s00284-021-02440-w
- Piazzon, M. C., F. Naya-Català, P. Simó-Mirabet, A. Picard-Sánchez, F. J. Roig, J. A. Calduch-Giner, A. Sitjà-Bobadilla y J. Pérez-Sánchez. 2019. **Sex, Age, and Bacteria: How the Intestinal Microbiota Is Modulated in a Protandrous Hermaphrodite Fish**. *Frontiers in Microbiology* 10: 2512. doi:10.3389/fmicb.2019.02512
- Piccolo, G., G. Centoducati, F. Bovera, R. Marrone y A. Nizza. 2013. **Effects of Mannan Oligosaccharide and Inulin on Sharpsnout Seabream (*Diplodus puntazzo*) in the Context of Partial Fish Meal Substitution by Soybean Meal**. *Italian Journal of Animal Science* 12(1): e22. doi:10.4081/ijas.2013.e22
- Pieters, N., J. Brunt, B. Austin y A. R. Lyndon. 2008. **Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum.)** *Journal of Applied Microbiology* 105: 723-732 doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03817.x.
- Qi, X., M. Xue, H. Cui, K. Yang, K. Song, J. Zha, G. Wang y F. Ling. 2020. **Antimicrobial activity of *Pseudomonas monteilii* JK-1 isolated from fish gut and its major metabolite, 1-hydroxyphenazine, against *Aeromonas hydrophila***. *Aquaculture* 526: 1-8  
<https://doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2020.735366>.
- Ramesh, D., A. Vinothkanna, A. K. Rai y V. S. Vignesh. 2015. **Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila***. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2): 268-276. doi:10.1016/j.fsi.2015.04.018
- Reza, A., H. Abdolmajid, M. Abbas y K. A. Abdolmohammad. 2009. **Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso***

- huso (Linnaeus, 1758).** *Journal of the World Aquaculture Society* 40: 771-779. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00297.x>
- Rimoldi, S., E. Gini, F. Iannini, L. Gasco y G. Terova. 2019. **The effects of dietary insect meal from *Hermetia illucens* prepupae on autochthonous gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Animals* 9: 1-17. <https://doi.org/10.3390/ani9040143>
- Ringø, E., S. H. Hoseinifar, K. Ghosh, H. V. Doan, B. R. Beck y S. K. Song. 2018. **Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update.** *Frontiers in Microbiology* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01818
- Ringø E. y E. Strøm. 1994. **Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora.** *Aquaculture Research* 25(6): 623-629. doi:10.1111/j.1365-2109.1994.tb00726.x
- Rodríguez-Estrada, U., S. Satoh, Y. Haga y H. J. S. Fushimi. S., 2009. **Effects of Single and Combined Supplementation of *Enterococcus faecalis*, Mannan Oligosaccharide and Polyhydroxybutyrate Acid on Growth Performance and Immune Response of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*.** *Aquaculture Science* 57: 609-617. <https://doi.org/10.11233/Aquaculturesci.57.609>
- Roeselers, G., E. K. Mittge, W. Z. Stephens, D. M. Parichy, C. M. Cavanaugh, K. Guillemin y J. F. Rawls. 2011. **Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish.** *The ISME Journal* 5: 1595-1608. doi:10.1038/ismej.2011.38.
- Ross, L. G., C. A. Martínez-Palacios, M. C. Aguilar-Valdez, M. C. M. Beveridge y M. C. Chávez-Sánchez. 2006. **Determination of feeding mode in fishes: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor* Jordan 1880.** *Journal of Fish Biology* 68: 1782-1794. doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01061.x.
- Rossi, M., A. Amaretti y S. Raimondi. 2011. **Folate Production by Probiotic Bacteria.** *Nutrients* 3(1): 118-134. doi:10.3390/nu3010118



- Ruzauskas, M., J. Armalyte, E. Lastauskiene, R. Šiugždinienė, I. Klimienė, R. Mockeliūnas y E. Bartkienė. 2021. **Microbial and Antimicrobial Resistance Profiles of Microbiota in Common Carps (*Cyprinus carpio*) from Aquacultured and Wild Fish Populations.** *Animals* 11: 1-14. <https://doi.org/10.3390/ani11040929>.
- Sarker, P. K., R. Yossa, S. Karanth, M. Ekker y G. W. Vandenberg. 2012. **Influences of dietary biotin and avidin on growth, survival, deficiency syndrome and hepatic gene expression of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*.** *Fish Physiology and Biochemistry* 38(4): 1183-1193. doi:10.1007/s10695-012-9604-6
- Soriano, E. L., D. T. Ramírez, D. R. Araujo, B. Gómez-Gil, L. I. Castro y C. G. Sánchez. 2018. **Effect of temperature and dietary lipid proportion on gut microbiota in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* juveniles.** *Aquaculture* 497: 269-277. doi:10.1016/j.Aquaculture.2018.07.065
- Standen, B. T., A. Rodiles, D. L. Peggs, S. J. Davies, G. A. Santos y D. L. Merrifield. 2015. **Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(20): 8403-8417. DOI 10.1007/s00253-015-6702-2
- Sutriana, A., M. N. Akter, R. Hashim y S. A. Mohd Nor. 2021. **Effectiveness of single and combined use of selected dietary probiotic and prebiotics on growth and intestinal conditions of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage, 1978) juvenile.** *Aquaculture International* 29: 2769-2791. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00777-4>
- Tan, H. Y., S.-W. Chen y S.-Y. Hu. 2019. **Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Fish & Shellfish Immunology*. doi:10.1016/j.fsi.2019.06.027
- Tan, C. K., N. F. M. Ikhsan, I. B. Suyub, M. J. Edward, N. Kaman y A. A. Samsudin. 2018. **Comparative study of gut microbiota in wild and captive Malaysian**

- Mahseer (*Tor tambroides*).** *Microbiology Open* e00734. doi:10.1002/mbo3.734
- Taoka, Y., H. Maeda, J. Jo, M. Jeon, S. C. Bai, W. Lee, K. Yuge y S. Koshio. 2006. **Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system.** *Fisheries Science* 72: 310-321.
- Tavares-Dias M. y M. L. Martins. 2017. **An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms.** *Journal of Parasitic Diseases* 41(4): 913-919.
- Tran, N.-T., Z. Li, H. Ma, Y. Zhang, H. Zheng, Y. Gong y S. Li. 2020. ***Clostridium butyricum*: a promising probiotic confers positive health benefits in aquatic animals.** *Reviews in Aquaculture* 12: 2573-2589. doi: 10.1111/raq.12459.
- Uren Webster, T. M., D. Rodriguez-Barreto, S. Consuegra y C. Garcia de Leaniz. 2020. **Cortisol-Related Signatures of Stress in the Fish Microbiome.** *Frontiers in Microbiology* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01621
- Vestrum, R. I., Forberg, T., B. Luef, I. Bakke, P. Winge, Y. Olsen y O. Vadstein. 2022. **Commensal and Opportunistic Bacteria Present in the Microbiota in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Larvae Differentially Alter the Hosts' Innate Immune Responses.** *Microorganisms* 10: 24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010024>
- Volkoff H. y S. London. 2018. **Nutrition and Reproduction in Fish.** *Encyclopedia of Reproduction* 743-748. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.20624-9
- Walhe R. A., S. S. Diwanay, M. S. Patole, R. Z. Sayyed, H. A. AL-Shwaiman, M. M. Alkhulaifi, A. M., Igorban, S. Danish y R. Datta. 2021. **Cholesterol Reduction and Vitamin B12 Production Study on *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus pentosus* Isolated from Yoghurt.** *Sustainability* 13(11): 5853. doi:10.3390/su13115853
- Wang, C., Z. Xu, S. Lu, H. Jiang, J. Li, L. Wang, Z. Fan, D. Wu, Y. Zhang, S. Han, Y. Liu, H. Liu y Z. Li. 2022. **Effects of dietary xylooligosaccharide on growth, digestive enzymes activity, intestinal morphology, and the expression of**

- inflammatory cytokines and tight junctions genes in triploid *Oncorhynchus mykiss* fed a low fishmeal diet. *Aquaculture Reports* 22: 100941. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100941>
- Wang, L., Y. Han, Z. Jiang, M. Sun, B. Si, F. Chen y N. Bao. 2017. **Interactive effects of dietary leucine and isoleucine on growth, blood parameters, and amino acid profile of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*.** *Fish Physiology and Biochemistry* 43(5): 1265-1278. doi:10.1007/s10695-017-0370-3
- Wanka, K. M., T. Damerau, B. Costas, A. Krueger, C. Schulz y S. Wuertz. 2018. **Isolation and characterization of native probiotics for fish farming.** *BMC Microbiology* 18(1). doi:10.1186/s12866-018-1260-2
- Welch T.J. y C. M. Good. 2013. **Mortality associated with Weissellosis (*Weissella* sp.) in USA farmed rainbow trout: Potential for control by vaccination.** *Aquaculture* 388: 122-127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.021>
- Wu, P., Y. Liu, C. Li, Y. Xiao, T. Wang, L. Lin y Y. Xie. 2021. **The Composition of Intestinal Microbiota From *Collichthys lucidus* and Its Interaction With Microbiota From Waters Along the Pearl River Estuary in China.** *Frontiers in Environmental Science* 9: 675856. doi: 10.3389/fenvs.2021.675856
- Xia, Y., M. Wang, F. Gao, M. Lu y G. Chen. 2020. **Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Animal Nutrition* 6: 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.07.002>.
- Yabe, S., Y. Aiba, Y. Sakai, M. Hazaka y A. Yokota. 2011. ***Thermogemmatispora onikobensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogemmatispora foliorum* sp. nov., isolated from fallen leaves on geothermal soils, and description of Thermogemmatisporaceae fam. nov. and Thermogemmatisporales ord. nov. within the class Ktedonobacteria.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 903-910. doi: 10.1099/ijs.0.024877-0
- Yeganeh Rastekenari, H., R. Kazami, A. Shenavar Masouleh, A. Banavreh, S. Najjar Lashgari, M. H. Sayed Hassani, R. Ghorbani Vaghei, M. Alizadeh Roudposhti y A. Hallajian. 2021. **Autochthonous probiotics *Lactococcus lactis* and**

- Weissella confusa* in the diet of fingerlings great sturgeon, *Huso huso*: effects on growth performance, feed efficiency, haematological parameters, immune status and intestinal morphology.** *Aquaculture Research* 52(8): 3687-3695. DOI: 10.1111/are.15213
- Yoshii, K., K. Hosomi, K. Sawane y J. Kunisawa. 2019. **Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity.** *Frontiers in Nutrition* 6. doi:10.3389/fnut.2019.00048
- You, C., S. Miao, S. Lin, S. Wang, K. Waiho y Y. Li. 2017. **Expression of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) biosynthesis genes and utilization of fatty acids during early development in rabbitfish *Siganus canaliculatus*.** *Aquaculture* 479: 774-779. <https://doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2017.07.028>
- Yousefian M. y M. S. Amiri. 2009. **A review of the use of prebiotic in Aquaculture for fish and shrimp.** *African Journal of Biotechnology* 8(25): 7313-7318.
- Zaineldin, A. I., S. Hegazi, S. Koshio, M. Ishikawa, A. Bakr, A. M. S. El-Keredy, M. A. O. Dawood, S. Dossou, W. Wang y Z. Yukun. 2018. ***Bacillus subtilis* as probiotic candidate for red sea bream: Growth performance, oxidative status, and immune response traits.** *Fish & Shellfish Immunology* 79: 303-312. doi:10.1016/j.fsi.2018.05.035
- Zehra S. M. A. Khan. 2013. **Dietary isoleucine requirement of fingerling catla, *Catla catla* (Hamilton), based on growth, protein productive value, isoleucine retention efficiency and carcass composition.** *Aquaculture International* 21(6): 1243-1259. doi:10.1007/s10499-013-9627-8
- Zhang, C., Q. Ai, K. Mai, B. Tan, H. Li y L. Zhang. 2008. **Dietary lysine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R.** *Aquaculture* 283: 123-127. doi:10.1016/j.Aquaculture.2008.06.035
- Zhao, J., Y. Liu, J. Jiang, P. Wu, G. Chen, W. Jiang, S. Li, L. Tang, S. Kuang, L. Feng y X. Zhou. 2012. **Effects of dietary isoleucine on growth, the digestion and absorption capacity and gene expression in hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian).** *Aquaculture* 368-369: 117-128. doi:10.1016/j.Aquaculture.2012.09.019

## XI.4 Referencias Apéndices

### Referencias A1

- Baesi, F., A. Aberoumand, S. Ziaei Nejad y M. Javaheri Baboli. 2017. **Effect of commercial probiotic *Lactobacillus* on fatty acids profile and nutritional value of *Cyprinus carpio* in Iran.** *Carpathian Journal of Food Science Technology* 9(4): 189-196.
- Gutierrez L. E. y R. C. M. da Silva. 1993. **Fatty acid composition of commercially important fish from Brazil.** *Scientia agrícola (Piracicaba)* 50(3): 478-483.
- Kinsella J. E. 1988. **Fish and seafood: Nutritional implication and quality issues.** *Food Technology Magazine* 15: 146-150.
- Martínez-Palacios, C.A., S. Concha-Santos, E. M. Toledo-Cuevas, M. G. Ríos-Durán, C. C. Martínez-Chávez, P. Navarrete-Ramírez, L. Raggi, C. Strussmann, J. P. Hualde, M. A. Demicheli y J. Fonseca-Madrigal. 2020. **High levels of docosahexaenoic acid are present in eight New World silversides (Pisces: Atherinopsidae).** *Neotropical Ichthyology* 18: 1-11. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2019-0089>.
- Piccolo, G., G. Centoducati, F. Bovera, R. Marrone y A. Nizza. 2013. **Effects of Mannan Oligosaccharide and Inulin on Sharpsnout Seabream (*Diplodus puntazzo*) in the Context of Partial Fish Meal Substitution by Soybean Meal.** *Italian Journal of Animal Science* 12(1): e22. doi:10.4081/ijas.2013.e22
- Pigott G. M. y B. W. Tucker. 1990. **Seafood Effects of Technology on Nutrition.** 1a. ed. CRC Press. New York, USA. 384 pp.
- Suloma, A., H. Y. Ogata, E. S. Garibay, D. R. Chavez y E. R. El-Haroun. 2008. **Fatty acid composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* muscles: a comparative study with commercially important tropical freshwater fish in Philippines.** *8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture* 921-932.
- Valencia, I., D. Ansorena y I. Astiasarán. 2006. **Nutritional and sensory properties of dry fermented sausages enriched with n-3 PUFAs.** *Meat Science* 72(4): 727-733. doi:10.1016/j.meatsci.2005.09.022

**Referencias A2**

- Asaduzzaman, M., E. Sofia, A. Shakil, N. F. Haque, M. N. A. Khan, D. Ikeda, S. Kinoshita y A. B. Abol-Munafi. 2018. **Host gut-derived probiotic bacteria promote hypertrophic muscle progression and upregulate growth-related gene expression of slow-growing Malaysian Mahseer *Tor tambroides*.** *Aquaculture Reports* 9: 37-45. doi:10.1016/j.aqrep.2017.12.001
- Barroso, C., R. O. A. Ozório, A. Afonso, J. R. E. Moraes y B. Costas. 2014. **Immune responses and gut morphology in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed dietary probiotic supplementation and following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.** *Aquaculture Research* 47(3): 951-960. doi:10.1111/are.12553
- Dawood, M. A. O., A. E.-S. Metwally, M. E. El-Sharawy, A. M. Atta, Z. I. Elbially, H. M. R. Abdel-Latif y B. A. Paray. 2020. The role of  $\beta$ -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. *Aquaculture* 735205. doi:10.1016/j.Aquaculture.2020.735205
- Hollas J. M. 2004. Modern Spectroscopy. 4a ed. John Wiley Sons. Chichester, Inglaterra, 452 pp.
- Hopf, F.A., R. F. Shea y M. O. Scully. 1973. **Theory of optical free-induction decay and two-photon superradiance.** *Physical Review* 7: 2105-2110. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.7.2105>
- R Core Team. 2013. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> (Accesada en junio de 2021)
- Schock, T. B., J. Duke, A. Goodson, D. Weldon, J. Brunson, J. W. Leffler y D. W. Bearden. 2013. **Evaluation of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Health during a Superintensive Aquaculture Growout Using NMR-Based Metabolomics.** *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059521>
- Sewaka, M., C. Trullas, A. Chotiko, C. Rodkhum, N. Chansue, S. Boonanuntanasarn y N. Pirarat. 2019. **Efficacy of synbiotic Jerusalem artichoke and**

- Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented diets on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, immune parameters and protection against *Aeromonas veronii* in juvenile red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Fish & Shellfish Immunology*. doi:10.1016/j.fsi.2018.11.026**
- Xia, J., I. V. Sinelnikov, B. Han y D. S. Wishart. 2015. **MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful.** *Nucleic Acids Research* 43: 251-257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv380>

## XII. ANEXOS

**Anexo 1. Resumen de estudios sobre efectos de suplementos prebióticos, probióticos y simbióticos administrados en peces con importancia comercial.**

**Resumen de estudios sobre efectos de suplementos prebióticos administrados en peces con importancia comercial.**

Prebiótico	Especie	Dosis Duración	Efecto	Referencia
Inulina	Salmón del Ártico <i>Salvelinus alpinus</i>	15% 28 días	↓Enterocitos del intestino distal	Olsen <i>et al.</i> 2001
Pared celular (β-glucanos y MOS)	Dorada <i>Sparus aurata</i>	0.1, 0.5 y 1% 28 días	↑Actividad fagocítica, en 0.5 y 1% ↑Actividad citotóxica en 0.1%	Ortuño <i>et al.</i> 2002
Inulina, Oligofruktosa (es un tipo de Fructooligosacárido o FOS), Lactosucrosa	Rodaballo <i>Psetta maxima</i>	2% 26 días	→Supervivencia Oligofruktosa ↑crecimiento Inulina y lactosucrosa ↑microbiota intestinal (conteo por medio TCBS)	Mahious <i>et al.</i> 2006
β-glucanos	Rohu <i>Labeo rohita</i>	0.01, 0.025, 0.05% 56 días	↑Crecimiento fagocitosis, lisozima, complemento hemolítico, actividad bactericida	Misra <i>et al.</i> 2006
β-glucanos	<i>Pseudosciaena crocea</i>	0.5 y 1% 56 días	↑Crecimiento, lisozima, fagocitosis, respiración, protección contra <i>Vibrio harveyi</i>	Ai <i>et al.</i> 2007
Pared celular (β-glucanos y MOS)	Rohu <i>Labeo rohita</i>	0.5% 15 días	↑Actividad fagocítica	Pal <i>et al.</i> 2007
MOS	Lubina <i>Dicentrarchus labrax</i>	0.2 y 0.4% 63 días	↑Crecimiento	Torrecillas <i>et al.</i> 2007



MOS	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.15, 0.3 y 0.45% 90 días	↑Crecimiento en Mananoligosacárido 0.15% ↑Longitud de las microvellosidades Mananoligosacárido 0.15 y 0.3%	Yilmaz <i>et al.</i> 2007
MOS, FOS, Galactooligosacárido o GOS	Salmón Atlántico <i>Salmo salar</i>	1% 120 días	→Crecimiento y supervivencia Mananoligosacárido 1% ↓actividad de lisozima	Grisdale-Helland <i>et al.</i> 2008
MOS	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.2% 58 días	↑Longitud y densidad de las microvellosidades ↓Bacterias intestinales <i>Aeromonas</i> spp. y <i>Vibrio</i> spp. (agar TSA)	Dimitroglou <i>et al.</i> 2009
Inulina	Beluga <i>Huso huso</i>	1, 2 y 3% 56 días	↓Crecimiento y supervivencia ↓Bacterias totales ↑Bacterias ácido lácticas	Reza <i>et al.</i> 2009
Inulina	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	0.5% 60 días	↑Crecimiento y supervivencia	Ibrahem <i>et al.</i> 2010
FOS, MOS (Bio-MOS®), GOS (Previda™)	Corvina roja <i>Sciaenops ocellatus</i>	1% 56 días	↑Crecimiento en todos excepto en Bio-MOS® ↓Supervivencia en Bio-MOS® ↑Actividad de lisozima ↑Longitud de microvellosidades en el intestino excepto en todos en Bio-MOS® (1%)	Zhou <i>et al.</i> 2010
Immunogen® proporcionado por Soroush Radian Co., Tehran, Iran	Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	0.05, 0.1, 0.15 y 0.25% 56 días	→Crecimiento Immunogen® 0.15 y 0.25% ↑leucocitos	Ebrahimi <i>et al.</i> 2012
Arabinosilanoligosacárido- 3-0.25, Arabinosilanoligosacárido- 32-0.30	Esturión siberiano <i>Acipenser baerii</i>	2% 84 días	↑Supervivencia y actividad fagocítica →Actividad de lisozima ↑Bacterias ácido lácticas y <i>Clostridium</i> sp. (PCR- electroforesis en gel de gradiente desnaturizante) Arabinosilanoligosacárido-32-0.30 ↑crecimiento	Geraylou <i>et al.</i> 2012

			Arabinoxilanoligosacárido-32-0.30 ↑ácidos grasos de cadena corta (acetato y butirato)	
Inulina, FOS	Trucha arcoíris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.5 y 1% 49 días	↑ Crecimiento → Bacterias intestinales ( <i>Aeromonas</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp. y bacterias grampositivas) (medio Ryan y TCBS, agar Columbia CNA)	Ortiz <i>et al.</i> 2012
β-glucanos	Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	0.1, 1 y 2% 28 días	↓Microbiota autóctona ↑Longitud y densidad de microvellosidades en 1%	Kühlwein <i>et al.</i> 2013
XOS	Lubina <i>Dicentrarchus labrax</i>	0.5 y 1% 84 días	↑Crecimiento (0.5%) y supervivencia contra patógeno <i>Aeromonas hydrophila</i> (1%)	Abdelmalek <i>et al.</i> 2015
Inulina	Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	0.5 y 1% 49 días	→Crecimiento y actividad enzimática (lipasa, proteasa y amilasa) ↑Supervivencia	Eshaghzadeh <i>et al.</i> 2015
β-glucanos	Trucha arcoíris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.1 y 0.2% 60 días	↑Crecimiento y lisozima	Ghaedi <i>et al.</i> 2015
Inulina, MOS	Carpa herbívora <i>Ctenopharyngodon idella</i>	0.3 y 2% 56 días	Inulina y mananoligosacárido 2% ↑crecimiento y actividad bactericida	Mo <i>et al.</i> 2015
Inulina	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	0.25 y 0.5%, 0.5 y 1% 56 días	↑Crecimiento →Supervivencia ↑Células sanguíneas y caliciformes Inulina 0.5% y tubérculo 0.5 y 1% ↑actividad de lisozima	Tiengtam <i>et al.</i> 2015
MOS	Lubina <i>Dicentrarchus labrax</i>	0.1, 0.2, 0.3 y 0.4% 75 días	↑Crecimiento y tamaño de microvellosidades ↑Supervivencia (0.1%)	Salem <i>et al.</i> 2016

FOS, Inulina, GOS	Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	2% 60 días	GOS ↑crecimiento y actividad de lisozima	Hoseinifar <i>et al.</i> 2017
Pared celular ( $\beta$ -glucanos y MOS)	Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	0.1 y 0.2% 60 días	↑Crecimiento, glóbulos blancos ↑Actividad fagocítica y expresión de genes relacionados al sistema inmune en 0.2%	Abu-Elala <i>et al.</i> 2018
IMO	Bagre Africano <i>Clarias gariepinus</i>	0.5% 56 días	→Crecimiento	Romano <i>et al.</i> 2018
MOS	Bagre <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	0.2, 0.4, 0.6 y 0.8% 84 días	↑Supervivencia y actividad de lisozima contra el patógeno <i>Aeromonas hydrophila</i>	Akter <i>et al.</i> 2019
$\beta$ -glucanos	Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	0.1% 56 días	↓Bacterias intestinales <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Flavobacterium columnare</i>	Amphan <i>et al.</i> 2019
$\beta$ -glucanos	Carpa cruciana <i>Carassius auratus</i> var. Pengze	0.1% 70 días	→Crecimiento ↑Sistema inmune y tamaño microvellosidades	Cao <i>et al.</i> 2019
Inulina	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	1 y 2% 56 días	↑Crecimiento y supervivencia en 1% ↑Incremento de actividad de enzimas digestivas en 1%	Özlüer-Hunt <i>et al.</i> 2019
Inulina	Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	0.25, 0.5 y 1% 90 días	↑Crecimiento en 0.25%	Abdel-Moneim <i>et al.</i> 2020
$\beta$ -glucanos	Palometa <i>Trachinotus ovatus</i>	0.1, 0.2% y 0.4% 56 días	↑Crecimiento en 0.1%	Do-Huu 2020
$\beta$ -glucanos	Ciprínido <i>Rutilus rutilus</i>	1% 14 días	→Crecimiento ↑Sistema inmune	Kazuń <i>et al.</i> 2020

Inulina	Surubí atigrado <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	0.7% 12 días	→Crecimiento ↓Tamaño microvellosidades	Oliveira <i>et al.</i> 2020
MOS	Híbridos de mero <i>Epinephelus lanceolatus</i> ♂ y <i>Epinephelus fuscoguttatus</i> ♀	0.3, 0.6, 1.0 y 2.0% 63 días	↑Actividad de lisozima y microvellosidades	Ren <i>et al.</i> 2020
Pectina	Trucha arcoíris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.5, 1.0 y 2.0% 63 días	↑Crecimiento en 0.5 y 1.0% ↑Actividad de enzimas digestivas y de lisozima	Hoseinifar <i>et al.</i> 2021
β-glucanos	Tetra rojo <i>Hyphessobrycon eques</i>	0.05, 0.1, y 0.2% 42 días	→Crecimiento ↑Sistema inmune en 0.2%	Furlan-Murari <i>et al.</i> 2022
XOS	Trucha arcoíris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.25, 0.5, 0.75 y 1.0% 56 días	↑Crecimiento en 1.0% ↑Incremento de actividad de enzimas digestivas en 1% ↑Incremento de <i>Lactobacillus</i> en 0.5, 0.75 y 1.0%	Wang <i>et al.</i> 2022

Los símbolos representan incremento (↑), no efecto (→) o decremento (↓) en el parámetro de respuesta del prebiótico relativo al testigo.

## Resumen de estudios sobre efectos de suplementos probióticos administrados en peces con importancia comercial.

Probiótico	Especie	Dosis Duración	Efecto	Referencia
<i>Carnobacterium</i> sp.	Salmón del Atlántico <i>Salmo salar</i> y trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	$5 \times 10^7$ células/g 14 días	↓Bacterias patógenas	Robertson <i>et al.</i> 2000
<i>Streptococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	0.1% 63 días	↑Crecimiento y supervivencia	Lara-Flores <i>et al.</i> 2003
<i>Roseobacter</i> sp.	Larva de lenguado <i>Scophthalmus maximus</i>	$10^7$ UFC/mL 5 días	↑Supervivencia	Hjelm <i>et al.</i> 2004
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM 1136	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	$2.45 \times 10^9$ y $1.07 \times 10^{11}$ UFC/g 30 días	↑Actividad fagocítica y de lisozima	Panigrahi <i>et al.</i> 2004
<i>Bacillus toyoi</i> y <i>Bacillus cereus</i>	Dentón juvenil <i>Dentex dentex</i>	0.05, 0.1 y 0.2% 42 días	↑Supervivencia	Hidalgo <i>et al.</i> 2006
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> B26 y <i>C. divergens</i> B33	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	$1 \times 10^7$ células/g 14 días	↑Actividad fagocítica en B26 ↑Actividad de lisozima en B33	Kim y Austin 2006
Mezcla compuesta por <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Clostridium butyricum</i> y	Lenguado <i>Paralichthys olivaceus</i>	$1.6 \times 10^7$ , $1.2 \times 10^8$ , $2 \times 10^7$ y $1.6 \times 10^7$ UFC/g 50 días	↑Supervivencia y actividad de lisozima	Taoka <i>et al.</i> 2006

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Bacteria fotosintética, <i>Bacillus</i> sp. y Bacteria fotosintética + <i>Bacillus</i> sp.	Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	1g/kg 60 días	↑Crecimiento ↑Actividad enzimática (proteasa, amilasa y lipasa)	Wang y Xu 2006
<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus sakei</i>	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	1x10 <sup>6</sup> UFC/g 14 días	↑Actividad fagocítica y de bacterias ácido lácticas	Balcázar <i>et al.</i> 2007
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>B. subtilis</i> + <i>L. acidophilus</i>	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	1x10 <sup>7</sup> células/mL 28 días	↑Crecimiento ↑Supervivencia en mezcla ↑Actividad de lisozima	Aly <i>et al.</i> 2008
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>B.</i> <i>licheniformis</i>	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	1x10 <sup>8</sup> -1x10 <sup>9</sup> UFC/g 63 días	↑Crecimiento y supervivencia	Bagheri <i>et al.</i> 2008
<i>Aeromonas sobria</i> y <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	1x10 <sup>8</sup> -1x10 <sup>10</sup> células/g 14 días	↑Supervivencia	Pieters <i>et al.</i> 2008
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	1x10 <sup>7</sup> UFC/g 30 días	↑Supervivencia	Vendrell <i>et al.</i> 2008
<i>Micrococcus luteus</i> y <i>Pseudomonas</i> spp.	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	1x10 <sup>7</sup> células/g 90 días	↑Crecimiento, ↑supervivencia y ↑eritrocitos en <i>M. luteus</i>	Abd El-Rhman <i>et al.</i> 2009
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bagre africano <i>Clarias gariiepinus</i>	3.01x10 <sup>7</sup> UFC/g 84 días	↑Crecimiento, ↑supervivencia, ↑eritrocitos, glóbulos blancos	Al-Dohail <i>et al.</i> 2009

<i>Shewanella putrefaciens</i>	Lenguado <i>Solea senegalensis</i>	1x10 <sup>9</sup> UFC/g 60 días	↑Crecimiento	De Rodríguez <i>et al.</i> 2009
Probiótico comercial Biogen®	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	0.3% 98 días	↑Crecimiento	Mehrim 2009
<i>Bacillus subtilis</i> NIOFSD017, <i>Lactobacillus plantarum</i> NIOFSD018, <i>B. subtilis</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NIOFSD019	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	1x10 <sup>7</sup> y 1x10 <sup>4</sup> UFC/g 60 días	↑Crecimiento ↑Actividad enzimática (amilasa, proteasa y lipasa) en bacterias ↑Actividad amilasa en <i>S. cerevisiae</i>	Essa <i>et al.</i> 2010
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	1x10 <sup>7</sup> UFC/g 32 días	↑Supervivencia ↑Actividad enzimática (lisozima) ↑Bacterias ácido lácticas (conteo por medio MRS)	Ferguson <i>et al.</i> 2010
<i>Pseudomonas</i> M162	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	2x10 <sup>9</sup> UFC/g 14 días	↑Supervivencia y actividad de leucocitos y lisozima	Korkea-aho <i>et al.</i> 2012
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. lactis</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>B. subtilis</i> + <i>S. cerevisiae</i> y <i>B. subtilis</i> + <i>L. lactis</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Ciprínido rohu <i>Labeo rohita</i>	1x10 <sup>11</sup> UFC/kg 60 días	↑Crecimiento y digestibilidad en mezcla de <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> y <i>S. cerevisiae</i> ↑Actividad enzimática (proteasa y lipasa) en todas las mezclas	Mohapatra <i>et al.</i> 2012

<i>Bacillus subtilis</i> Ch9	Carpa herbívora <i>Ctenopharyngodon idella</i>	$1 \times 10^9$ , $3 \times 10^9$ y $5 \times 10^9$ UFC/kg 56 días	↑Crecimiento ↑Bacterias autóctonas <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> <i>B. subtilis</i> ( $3 \times 10^9$ y $5 \times 10^9$ UFC/kg) ↑actividad enzimática (proteasa, amilasa y lipasa)	Wu <i>et al.</i> 2012
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Corvina <i>Argyrosomus regius</i> y sargo <i>Diplodus sargus</i>	1 y 2 % 28 días	↑Actividad enzimática (proteasa y amilasa) en sargo	Castro <i>et al.</i> 2013
<i>Lactobacillus plantarum</i> VSG3	Ciprínido rohu <i>Labeo rohita</i>	$1 \times 10^6$ , $1 \times 10^8$ y $1 \times 10^{10}$ UFC/g 60 días	↑Crecimiento, supervivencia y actividad de lisozima	Giri <i>et al.</i> 2013
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	$2.81 \times 10^4$ 6 UFC/g 42 días	↑Respuesta inmune (expresión de citocina proinflamatoria TNF $\alpha$ ) y neutrófilos	Standen <i>et al.</i> 2013
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	$7 \times 10^4$ , $8 \times 10^5$ , $1 \times 10^5$ y $4.2 \times 10^6$ células/g 98 días	↑Crecimiento y supervivencia	Ayyat <i>et al.</i> 2014
<i>Bacillus coagulans</i>	Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	$1 \times 10^7$ , $2 \times 10^7$ y $4 \times 10^7$ UFC/g 45 días	↑Crecimiento	Xu <i>et al.</i> 2014



<i>Lactococcus lactis</i> BFE920 y <i>Lactobacillus plantarum</i> FGL0001	Lenguado verde <i>Paralichthys olivaceus</i>	log10 7.0 UFC/g 30 días	↑Crecimiento	Beck <i>et al.</i> 2015
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Esturión persa <i>Acipenser baerii</i>	1x10 <sup>7</sup> , 1x10 <sup>8</sup> y 1x10 <sup>9</sup> UFC/g 56 días	↑Crecimiento en 10 <sup>8</sup>	Pourgholam <i>et al.</i> 2015
<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Pediococcus acidilactici</i> (AquaStar® Growout)	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	5g/kg 56 días	↑ Longitud y densidad de microvellosidades ↑Leucocitos ↑Bacterias ácido lácticas	Standen <i>et al.</i> 2015
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> y mezcla de <i>L. rhamnosus</i> y <i>L. lactis</i>	Pargo japonés <i>Pagrus major</i>	1x10 <sup>6</sup> UFC/g 56 días	↑Crecimiento ↑Bacterias ácido lácticas (conteo por medio MRS)	Dawood <i>et al.</i> 2016
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Larva pez zebra <i>Danio rerio</i>	1x10 <sup>6</sup> UFC/mL 8 días	↓Apetito ↑Longitud de enterocitos y microvellosidades ↑ <i>Lactobacillus</i> y <i>Streptococcus</i>	Falcinelli <i>et al.</i> 2016
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Clostridium butyricum</i>	Japuta plateada <i>Pampus argenteus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/g 60 días	↑Crecimiento ↑Actividad enzimática (proteasa, lipasa y amilasa) ↑Actividad de lisozima	Gao <i>et al.</i> 2016
<i>Lactobacillus plantarum</i> AH 78	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	0.5%, 1% y 2% 40 días	<i>L. plantarum</i> 1% ↑crecimiento	Hamdan <i>et al.</i> 2016

<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pez blanco del Caspio <i>Rutilus kutum</i>	$1 \times 10^9$ , $2 \times 10^9$ y $3 \times 10^9$ UFC/kg 56 días	↑Crecimiento y supervivencia	Valipour <i>et al.</i> 2016
<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ciprínido rohu <i>Labeo rohita</i>	$1 \times 10^7$ UFC/g 60 días	↑ Crecimiento y supervivencia	Munirasu <i>et al.</i> 2017
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Carpín dorado <i>Carassius auratus</i>	$3 \times 10^7$ CFU/g 98 días	↑Crecimiento	Ahire <i>et al.</i> 2018
<i>Bacillus cereus</i>	Cachama o pacú negro <i>Colossoma macropomum</i>	$4.2 \times 10^4$ , $3.9 \times 10^6$ y $3.3 \times 10^8$ UFC/g) 120 días	↑Crecimiento y supervivencia	Dias <i>et al.</i> 2018
<i>Lactobacillus</i> spp.	Guarupaya <i>Astyanax bimaculatus</i>	$1 \times 10^7$ UFC/g 90 días	↑Supervivencia	Vieira de Moraes <i>et al.</i> 2018
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM1136 y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM5805	Tilapia del nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	$1 \times 10^8$ UFC/g 42 días	↑ Crecimiento y supervivencia en <i>L. lactis</i>	Xia <i>et al.</i> 2018
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bagre <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	$1 \times 10^3$ , $1 \times 10^5$ , $1 \times 10^7$ y $1 \times 10^9$ UFC/g 84 días	↑ Crecimiento en $10^5$ y $10^7$ Supervivencia 100% en $10^3$ , $10^5$ y $10^7$ ↑Enzimas digestivas en $10^7$ ↑Bacterias ácido lácticas ↑Longitud de microvellosidades en $10^5$	Akter <i>et al.</i> 2019

			y10 <sup>7</sup>	
<i>Bacillus velezensis</i> K2	Mero <i>Epinephelus lanceolatus</i> ♂ y <i>E. fuscoguttatus</i> ♀	1x10 <sup>7</sup> UFC/g 28 días	↑Supervivencia contra reto de infección con <i>Vibrio harveyi</i>	Li <i>et al.</i> 2019
<i>Lactobacillus delbrukei</i> subs <i>p. bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Citrobacter farmeri</i>	Juvenil trucha arcoíris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	5x10 <sup>7</sup> UFC/g 60 días	↑Crecimiento con <i>L. acidophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i>	Mohammadian <i>et al.</i> 2019
<i>Bacillus</i> spp.	Rohu <i>Labeo rohita</i>	1x10 <sup>7</sup> células/g 60 días	↑Crecimiento en combinación de <i>B. methylotrophicus</i> y <i>B. licheniformis</i>	Mukherjee <i>et al.</i> 2019
<i>Lactobacillus plantarum</i> L-137	Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	10, 20 y 50 ppm en el alimento 150 días	↑Crecimiento en 50 ppm	Nguyen <i>et al.</i> 2019
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	0.1x10 <sup>5</sup> , 1x10 <sup>6</sup> y 1x10 <sup>7</sup> UFC/g 56 días	↑Crecimiento en 1X10 <sup>6</sup>	Zhang <i>et al.</i> 2019
<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>L. lactis</i> + <i>E. faecalis</i>	Pez cabeza de serpiente <i>Channa argus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/g 56 días	↑Crecimiento en <i>Lactococcus</i> ↑Sistema inmune	Kong <i>et al.</i> 2020
<i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>B. cereus</i>	Barramundi <i>Lates calcarifer</i>	1x10 <sup>9</sup> UFC/g 42 días	↑Crecimiento ↑Actividad enzimática (proteasa, lipasa)	Ghanei-Motlagh <i>et al.</i> 2021
Probióticos comerciales AquaStar® ( <i>Bacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp.,	Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	AquaStar® (0.0015g/m <sup>3</sup> de agua por día)	↑Crecimiento ↑Actividad de lisozima ↑Genes de crecimiento (IGF-1 y GHR) y de	EI-Kady <i>et al.</i> 2022

<i>Enterococcus</i> sp.) y EM® ( <i>Rhodopseudomonas</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp.)		EM® (10 mL/m <sup>3</sup> de agua por día) 60 días	sistema inmune (TNF-α y IL-1B)	
--	--	---	--------------------------------	--

Los símbolos representan incremento (↑), no efecto (→) o decremento (↓) en el parámetro de respuesta del probiótico relativo al testigo.

### Resumen de estudios sobre efectos de suplementos simbióticos administrados en peces con importancia comercial.

Especie	Prebiótico (dosis)	Probiótico (dosis)	Simbiótico	Duración	Efecto	Referencia
Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Mananoligosacárido o MOS (0.4%) y Polihidroxibutirato (1%)	<i>Enterococcus faecalis</i> (1%)	MOS + <i>E. faecalis</i> , Polihidroxibutirato + <i>E. faecalis</i> y  MOS + Polihidroxibutirato + <i>E. faecalis</i>	84 días	↑ Crecimiento (excepto <i>E. faecalis</i> y Polihidroxibutirato) ↑ Actividad hemolítica y fagocítica (excepto Polihidroxibutirato)	Rodríguez-Estrada <i>et al.</i> 2009
Corvina amarilla <i>Larimichthys crocea</i>	Fructooligosacárido (FOS) 0.2 y 0.4%	<i>Bacillus subtilis</i> 0.42x10 <sup>7</sup> UFC/g y 1.35x10 <sup>7</sup> UFC/g	FOS + <i>B. subtilis</i>	70 días	→Supervivencia ↑ Crecimiento en <i>B. subtilis</i> (1.35 UFC/g) en los simbióticos <i>B. subtilis</i> (1.35 UFC/g) más FOS0.2% y en los simbióticos <i>B. subtilis</i> (1.35 UFC/g) más FOS 0.4%	Ai <i>et al.</i> 2011

Cobia <i>Rachycentron canadum</i>	Quitosano (0.3 y 0.6%)	<i>B. subtilis</i> (0.1 y 0.2%) $2 \times 10^{10}$ UFC/g	Quitosano + <i>B. subtilis</i>	56 días	→ Supervivencia ↑ Crecimiento excepto en simbiótico <i>B. subtilis</i> 2.0 g/kg y quitosano 3.0 g/kg	Geng <i>et al.</i> 2011
Lenguado verde <i>Paralichthys olivaceus</i>	FOS (0.5%), MOS (0.5%) FOS + MOS (0.25 y 0.25%)	<i>Bacillus clausii</i> ( $1 \times 10^7$ UFC/g)	FOS + <i>B. clausii</i> , MOS + <i>B. clausii</i> y FOS + MOS + y <i>B. clausii</i>	56 días	↑ Actividad de amilasa Prebióticos y simbióticos ↑ crecimiento <i>B. clausii</i> y simbióticos ↑ actividad de lisozima Simbióticos ↑ actividad de proteasa	Ye <i>et al.</i> 2011
Surubí <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> y <i>P. fasciatum</i> cross	Inulina (0.5%)	<i>Weissella cibaria</i> (7.87 log UFC/g)	Inulina + <i>W. cibaria</i>	15 días	↑ Bacterias ácido lácticas ↓ <i>Vibrio</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp. Simbiótico ↑ lisozima Inulina y simbiótico ↑ eritrocitos	Mouriño <i>et al.</i> 2012
Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	MOS (0.25 y 0.5%)	<i>Enterococcus faecalis</i> (0.25 y 0.5%)	MOS + <i>E. faecalis</i> (0.25 y 0.25%) y MOS + <i>E. faecalis</i> (0.5 y 0.5%)	84 días	↑ Crecimiento ↑ Actividad hemolítica y fagocítica	Rodríguez-Estrada <i>et al.</i> 2013

Totoaba <i>Totoaba macdonaldi</i>	Levadura GroBiotic® (2%)	<i>Bacillus</i> Aquablend® (11x10 <sup>9</sup> UFC/kg)	Levadura + <i>Bacillus</i>	109 días	→Crecimiento y supervivencia Levadura y simbiótico ↑ longitud de microvellosidades Simbiótico ↑ cantidad total de bacterias	González-Félix <i>et al.</i> 2018
Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	β-glucano (0.05%)	<i>Aspergillus oryzae</i> (0.05%)	β-glucano + <i>A. oryzae</i>	60 días	↑ Crecimiento y actividad de enzimas digestivas Simbiótico ↑ longitud de microvellosidades de enterocitos del intestino Simbiótico y probiótico ↑ sistema inmune	Dawood <i>et al.</i> 2019
Tilapia <i>Oreochromis</i> spp.	Inulina y FOS (1.0%)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/g)	Inulina y FOS + <i>L. rhamnosus</i>	30 días	↑ Crecimiento y supervivencia Probiótico y simbiótico ↑ actividad de lisozima y tamaño de microvellosidades de enterocitos del intestino	Sewaka <i>et al.</i> 2019

Ciprínido <i>Rutilus rutilus</i>	$\beta$ -glucano (1.0%)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/g)	$\beta$ -glucano + <i>L. plantarum</i>	14 días	Prebiótico y simbiótico $\uparrow$ actividad de lisozima	Kazuń <i>et al.</i> 2020
Bagre <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	GOS (1.0%), MOS (0.4%) y $\beta$ -glucano (0.1%)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1.0%)	GOS + <i>S. cerevisiae</i> , MOS + <i>S. cerevisiae</i> y $\beta$ -glucano + <i>S. cerevisiae</i>	84 días	Prebióticos y simbióticos $\uparrow$ crecimiento, actividad de proteasa y tamaño de microvellosidades de enterocitos del intestino	Sutriana <i>et al.</i> 2021
Bagre <i>Clarias gariepinus</i>	Extracto de <i>Solanum ferox</i> (0.2%)	<i>Lactobacillus casei</i> (1.0%)	Extracto + <i>Lactobacillus casei</i> (0.2+1.0, 0.4+1.0 y 0.6+1.0%)	84 días	Simbiótico $\uparrow$ crecimiento y supervivencia	Hardi <i>et al.</i> 2022
Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	Polisacárido de cáscara de pistachio (0.1%)	<i>Pediococcus acidilactici</i> (0.2%)	<i>Pediococcus acidilactici</i> (0.2%) + Polisacárido (0.1%)	56 días	Simbiótico $\uparrow$ crecimiento y actividad de enzimas digestivas amilasa, lipasa y proteasa $\uparrow$ Supervivencia	Mohammadi <i>et al.</i> 2022

Los símbolos representan incremento ( $\uparrow$ ), no efecto ( $\rightarrow$ ) o decremento ( $\downarrow$ ) en el parámetro de respuesta del simbiótico relativo al testigo.

## Referencias Anexo 1

## Referencias estudios de prebióticos

- Abdelmalek, B. E., D. Driss, F. Kallel, M. Guargouri, H. Missaoui, S. E. Chaabouni, M. A. Ayadi y A. Bougatef. 2015. **Effect of xylan oligosaccharides generated from corncobs on food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters of *Dicentrarchus labrax* fingerlings.** *Fish Physiology and Biochemistry* 41: 1587-1596. DOI 10.1007/s10695-015-0110-5
- Abdel-Moneim, A. S. M. Y., I. M. E. Abdel-Monam, E. F. A. Mahi-Abd y S. S. Marzok. 2020. **Effects of Dietary Inulin as Prebiotic on Growth Performance, Immuno-haematological Indices and Ectoparasitic Infection of Fingerlings Nile Tilapia, *Oreochromis Niloticus*.** *The Egyptian Journal of Histology* 43: 88-103. DOI: 10.21608/ejh.2019.15495.1152
- Abu-Elala, N. M., N. A. Younis, H. O. AbuBakr, N. M. Ragaa, L. L. Borges y M. A. Bonato. 2018. **Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia.** *Egyptian Journal of Aquatic Research* 44 (4): 333-341. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.11.001>
- Ai, Q., K. Mai, L. Zhang, B. Tan, W. Zhang, W. Xu y H. Li. 2007. **Effects of dietary  $\beta$ -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*.** *Fish and Shellfish Immunology* 22: 394-402. DOI: 10.1016/j.fsi.2006.06.011
- Akter, M. N., R. Hashim, A. Sutriana, M. N. S. Azizah y M. Asaduzzaman. 2019. **Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performances, digestive enzyme activities and gut histomorphology of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878) juveniles.** *Aquaculture Research* 1-12. DOI: 10.1111/are.13938
- Amphan, S., S. Unajak, C. Printrakoon y N. Areechon. 2019. **Feeding-regimen of  $\beta$ -glucan to enhance innate immunity and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn., against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*.** *Fish and Shellfish Immunology* 87: 120-128. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.12.062
- Cao, H., R. Yu, Y. Zhang, B. Hu, S. Jian, C. Wen, K. Kajbaf, V. Kumar y G. Yang. 2019. **Effects of dietary supplementation with  $\beta$ -glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze).** *Aquaculture* 508: 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.064>
- Dimitroglou, A., D. L. Merrifield, R. Moate, S. J. Davies, P. Spring, J. Sweetman y G. Bradley. 2009. **Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** *Journal of Animal Science* 87: 3226-3234. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1428>
- Do-Huu H. 2020. **Influence of dietary  $\beta$ -glucan on length-weight relationship, condition factor and relative weight of pompano fish (*Trachinotus ovatus*, family carangidae).** *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 8(2): 85-91.



- Ebrahimi, G. H., H. Ouraji, M. K. Khalesi, M. Sudagar, A. Barari, M. Zarei Dangesaraki y K. H. Jani Khalili. 2012. **Effects of a prebiotic, Immunogen®, on feed utilization, body composition, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings.** *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96: 591-599. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01182.x>
- Eshaghzadeh, H., S. H. Hoseinifar, H. Vahabzadeh y E. Ringø. 2015. **The effects of dietary inulin on growth performances, survival and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fry.** *Aquaculture Nutrition* 21: 242-247. <https://doi.org/10.1111/anu.12155>
- Furlan-Murari, P.J., E. C. Suzuki de Lima, F. Pinheiro de Souza, A. M. Urrea-Rojas, A. C. Eugenio Pupim, E. J. de Almeida Araújo, P. C. Meletti, C. N. Seino Leal, L. Lima Fernandes y N. M. Lopera-Barrero. 2022. **Inclusion of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan in the ornamental fish, Jewel tetra (*Hyphessobrycon eques*), and its effects on growth, blood glucose, and intestinal histology.** *Aquaculture International*. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00815-1>
- Geraylou, Z., C. Souffreau, E. Rurangwa, S. D'Hondt, L. Callewaert, C. M. Courtin, J. A. Delcour, J. Buyse y F. Ollevier. 2012. **Effects of arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) performance, immune responses and gastrointestinal microbial community.** *Fish and Shellfish Immunology* 33: 718-724. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.010>
- Ghaedi, G., S. Keyvanshokoo, H. M. Azarm y M. Akhlaghi. 2015. **Effects of dietary  $\beta$ -glucan on maternal immunity and fry quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Aquaculture* 441: 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.023>
- Grisdale-Helland, B., S. J. Helland y D. M. Gatlin III. 2008. **The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *Aquaculture* 283: 163-167. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.012
- Hoseinifar, S.H., G. Rashidian, H. Ghafarifarsani, M. A. Jahazi, M. Soltani, H. Van Doan, E. El-Haroun y M. Paolucci. 2021. **Effects of Apple (*Malus pomila*) Pomace-Derived Pectin on the Innate Immune Responses, Expressions of Key Immune-Related Genes, Growth Performance, and Digestive Enzyme Activity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Animals* 11(7): 2117. doi:10.3390/ani11072117
- Hoseinifar, S. H., A. Ahmadi, M. Raeisi, S. M. Hoseini, M. Khalili y N. Behnampour. 2017. **Comparative study on immunomodulatory and growth enhancing effects of three prebiotics (galactooligosaccharide, fructooligosaccharide and inulin) in common carp (*Cyprinus carpio*).** *Aquaculture Research* 48: 3298-3307. <https://doi.org/10.1111/are.13156>
- Ibrahem, M. D., M. Fathi, S. Mesalhy y A. M. Abd El-Aty. 2010. **Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile**

- tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology* 29: 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.03.004>
- Kazuń, B., J. Małaczewska, K. Kazuń, R. Kamiński, D. Adamek-Urbańska y J. Żylińska-Urban. 2020. **Dietary administration of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan and *Lactobacillus plantarum* improves innate immune response and increases the number of intestine immune cells in roach (*Rutilus rutilus*). *BMC Veterinary Research* 16: 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02432-1>**
- Kühlwein, H., M. J. Emery, M. D. Rawling, G. M. Harper, D. L. Merrifield y S. J. Davies. 2013. **Effects of a dietary  $\beta$ -(1,3) (1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology* 115: 1091-1106. doi:10.1111/jam.12313**
- Mahious, A. S., F. J. Gatesoupe, M. Hervi, R. Metailler y F. Ollevier. 2006. **Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture International* 14: 219-229. <https://doi.org/10.1007/s10499-005-9003-4>**
- Misra, C. K., B. K. Das, S. B. Mukherjee y P. Pattnaik. 2006. **Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture* 255: 82-94. doi:10.1016/j.Aquaculture.2005.12.009**
- Mo, W. Y., Z. Cheng, W. M. Choi, C. H. I. Lun, Y. B. Man, J. T. F. Wong, X. W. Chen, S. C. Lau y M. H. Wong. 2015. **Use of food waste as fish feeds: effects of prebiotic fibers (inulin and mannanoligosaccharide) on growth and non-specific immunity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Environmental Science and Pollution Research* 22: 17663-17671. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4971-z>**
- Oliveira, F., R. Y. Dichoff-Kasaia, C. E. Fernandes, W. Souza y C. Meldau de Campos. 2020. **Probiotic, prebiotic and synbiotics supplementation on growth performance and intestinal histomorphometry *Pseudoplatystoma reticulatum* larvae. *Journal of Applied Aquaculture* 1-15. <https://doi.org/10.1080/10454438.2020.1841060>**
- Olsen, R. E., R. Myklebust, H. Kryvi, T. M. Mayhew y E. Ringø. 2001. **Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research* 32: 931-934. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00626.x>**
- Ortiz, L. T., A. Rebolé, S. Velasco, M. L. Rodríguez, J. Treviño, J. L. Tejedor y C. Alzueta. 2012. **Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 19: 475-482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00981.x>**
- Ortuño, J., A. Cuesta, A. Rodríguez, M. Angeles-Esteban y J. Meseguer. 2002. **Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 85: 41-50. DOI: 10.1016/s0165-2427(01)00406-8**

- Özlüer-Hunt, A., M. Çetinkaya, F. Özkan-Yılmaz, M. Yıldırım, M. Berköz y S.Yalın. 2019. **Effect of Dietary Supplementation of Inulin on Growth Performance, Digestion Enzyme Activities and Antioxidant Status of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 7 (9): 1344-1353. DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i9.1344-1353.2581>
- Pal, D., S. N. Joardar y B. Roy. 2007. **Immunostimulatory Effects of a Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Cell Wall Feed Supplement on Rohu (*Labeo rohita*), an Indian Major Carp**. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 59 (3): 175-181.
- Ren, Z., S. Wanga, Y. Caia, Y. Wua, L. Tiana, S. Wanga, L. Jianga, W. Guoa, Y. Suna y Y. Zhoua. 2020. **Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on growth performance, antioxidant capacity, non-specific immunity and immune-related gene expression of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂ × *Epinephelus fuscoguttatus*♀)**. *Aquaculture* 523. <https://doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2020.735195>
- Reza, A.,H. Abdolmajid, M. Abbas y K. A. Abdolmohammad. 2009. **Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758)**. *Journal of the World Aquaculture Society* 40: 771-779. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00297>.
- Romano, N., N. Kanmani, M. Ebrahimi, C. M. Chong, J. C. Teh, S. H. Hoseinifar, S. M. N. Amin, M. S. Kamarudin y V. Kumar. 2018. **Combination of dietary pre-gelatinized starch and isomaltooligosaccharides improved pellet characteristics, subsequent feeding efficiencies and physiological status in African catfish, *Clarias gariepinus*, juveniles**. *Aquaculture* 484: 293-302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2017.09.022>
- Salem, M., M. M. Gaber, M. Zaki y A. A. Nour. 2016. **Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition and intestine of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)**. *Aquaculture Research* 47: 3516-3525. doi:10.1111/are.12801
- Tiengtam, N., S. Khempaka, P. Paengkoum y S. Boonanuntanasarn. 2015. **Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *Animal Feed Science and Technology* 207: 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.05.008>
- Torrecillas, S., A. Makol, M. J. Caballero, D. Montero, L. Robaina, F. Real, J. Sweetman, L. Tort y M. S. Izquierdo. 2007. **Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides**. *Fish and Shellfish Immunology* 23: 969-981. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.007>
- Wang, C., Z. Xu, S. Lu, H. Jiang, J. Li, L. Wang, Z. Fan, D. Wu, Y. Zhang, S. Han, Y. Liu, H. Liu y Z. Li. 2022. **Effects of dietary xylooligosaccharide on growth, digestive enzymes activity, intestinal morphology, and the expression of inflammatory cytokines and tight junctions**

- genes in triploid *Oncorhynchus mykiss* fed a low fishmeal diet. *Aquaculture Reports* 22: 100941. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100941>
- Yilmaz, E., M. A. Genc y E. Genc. 2007. **Effects of Dietary Mannan Oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** *The Israeli journal of Aquaculture = Bamidgeh* 59 (3): 183-189.
- Zhou, Q. C., J. A. Buentello y D. M. Gatlin. 2010. **Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*).** *Aquaculture* 309: 253-257. <https://doi.org/10.1016/j.Aquaculture.2010.09.003>

### Referencias estudios de probióticos

- Abd El-Rhman, A. M., Y. A. E. Khattab y A. M. E. Shalaby. 2009. ***Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *Fish & Shellfish Immunology* 27: 175-180.
- Ahire, J. J., N. U. Mokashe y B. L. Chaudhari. 2018. **Effect of Dietary Probiotic *Lactobacillus helveticus* on Growth Performance, Antioxidant Levels, and Absorption of Essential Trace Elements in Goldfish (*Carassius auratus*).** *Probiotics and Antimicrobial Proteins* <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9428-5>
- Akter, M. N., R. Hashim, A. Sutriana, M. N. Siti-Azizah, M. Asaduzzaman. 2019. **Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performances, digestive enzyme activities and gut histomorphology of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878) juveniles.** *Aquaculture Research* 1–12.
- Al-Dohail, M. A., R. Hashim y M. Aliyu-Paiko. M. 2009. **Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling.** *Aquaculture Research* 40: 1642-1652.
- Aly, S. M., Y. A. Ahmed, A. A. Ghareeb y M. F. Mohamed. 2008. **Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections.** *Fish & Shellfish Immunology* 25: 128-136.
- Ayyat, M. S., H. M. Labib y H. K. A. Mahmoud. 2014. **Probiotic Cocktail as a Growth Promoter in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Journal of Applied Aquaculture* 26: 208-215.
- Bagheri, T., S. Aliakbar-Hedayati, V. Yavari, M. Alizade y A. Farzanfar. 2008. **Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding.** *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8: 43-48.
- Balcázar, J. L., I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Vendrell, O. Gironés y J. L. Muzquiz. 2007. **Enhancement of the immuneresponse and protection induced by probiotic lactic acid**

- bacteria against furunculosis in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*).** *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 51: 185-193.
- Beck, B. R., D. Kim, J. Jeon, S. M. Lee, H. K. Kim, O. J. Kim, J. Lee II., B. S. Suh, H. K. Do, K. H. Lee, W. H. Holzapfel, J. Y. Hwang, M. G. Kwon y S. K. Song. 2015. **The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).** *Fish & Shellfish Immunology* 42: 177-183.
- Castro, C., A. Pérez-Jiménez, F. Coutinho, P. Pousão-Ferreira, T. M. Brandão, A. Oliva-Teles y H. Peres. 2013. **Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*).** Effects of dietary brewers spent yeast supplementation. *Aquaculture* 416: 322-327. doi: 10.1016/j.Aquaculture.2013.09.042
- Dawood, M. A., S. Koshio, M. Ishikawa y S. Yokoyama. 2016. **Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of amberjack, *Seriola dumerili* juveniles.** *BioMed research international* 215: 1-11. doi:10.1155/2015/51419
- De Rodrigáñez, M. S., P. Díaz-Rosales, M. Chabrilón, H. Smidt, S. Arijo, J. M. León-Rubio, F. J. Alarcón, M. C. Balebona, M. A. Moriñigo, J. B. Cara y F. J. Moyano. 2009. **Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858).** *Aquaculture Nutrition* 15: 177-185.
- Dias, J. A. R., H. A. Abe, N. C. Sousa, M. V. S. Couto, C. A. M. Cordeiro, J. O. Meneses, F. S. Cunha, J. L. P. Mouriño, M. L. Martins, L. A. L. Barbas, P. C. F. Carneiro, A. N. Maria y R. Y. Fujimoto. 2018. **Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*.** *Aquaculture Research* 49: 3063-3070.
- El-Kady, A. A., F. I. Magouz, S. A. Mahmoud y M. M. Abdel-Rahim. 2022. **The effects of some commercial probiotics as water additive on water quality, fish performance, blood biochemical parameters, expression of growth and immune-related genes, and histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Aquaculture* 546: 737249. doi:10.1016/j.Aquaculture.2021.737249
- Essa, M. A., S. S. El-Serafy, M. M. El-Ezabi, S. M. Daboor, N. A. Esmael y S. P. Lall. 2010. **Effect of Different Dietary Probiotics on Growth, Feed Utilization and Digestive Enzymes Activities of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *Journal of the Arabian Aquaculture Society* 5: 143-162.
- Falcinelli, S., A. Rodiles, S. Unniappan, S. Picchiatti, G. Gioacchini, D. L. Merrifield y O. Carnevali. 2016. **Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model.** *Scientific Reports* 6: 1-13. DOI: 10.1038/srep18061

- Ferguson, R. M. W., D. L. Merrifield, G. M. Harper, M. D. Rawling, S. Mustafa, S. Picchiatti, J. L. Balcázar y S. J. Davies. 2010. **The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *Journal of Applied Microbiology* 109: 851-862. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04713.x
- Gao, Q., C. Xiao, M. Min, C. Zhang, S. Peng y Z. Shi. 2016. **Effects of probiotics dietary supplementation on growth performance, innate immunity and digestive enzymes of silver pomfret, *Pampus argenteus***. *Indian Journal Of Animal Research* 50 (6): 936-941.
- Ghanei-Motlagh, R., T. Mohammadian, D. Gharibi, M. Khosravi, E. Mahmoudi, M. Zarea, M. El-Matbouli y S. Menanteau-Ledouble. 2021. **Quorum quenching probiotics modulated digestive enzymes activity, growth performance, gut microflora, haemato-biochemical parameters and resistance against *Vibrio harveyi* in Asian seabass (*Lates calcarifer*)**. *Aquaculture* 531: 735874. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735874
- Giri, S. S., V. Sukumaran y M. Oviya. 2013. **Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita***. *Fish & Shellfish Immunology* 34: 660-666.
- Hamdan, A. M., A. F. M. El-Sayed y M. M. Mahmoud. 2016. **Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *Journal of applied microbiology* 120: 1061-1073.
- Hidalgo, M. C., A. Skalli, E. Abellán, M. Arizcun y G. Cardenete. 2006. **Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities**. *Aquaculture Nutrition* 12: 256-266.
- Hjelm, M., Ø. Bergh, A. Riaza, J. Nielsen, J. Melchiorson, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck y L. Gram. 2004. **Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units**. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 360-371.
- Kim D. y B. Austin. 2006. **Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics**. *Fish & Shellfish Immunology* 21: 513-524.
- Kong, Y., C. Gao, X. Du, J. Zhao, M. Li, X. Shan y G. Wang. 2020. **Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead fish (*Channa argus*)**. *Fish & Shellfish Immunology* 102: 412-421. doi:10.1016/j.fsi.2020.05.003
- Korkea-aho, T. L., A. Papadopoulou, J. Heikkinen, A. Von Wright, A. Adams, B. Austin y K. D. Thompson. 2012. ***Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity**. *Journal of Applied Microbiology* 113: 24-35.
- Lara-Flores, M., M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzmán-Méndez y W. López-Madrid. 2003. **Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast**

- Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Aquaculture* 216: 193-201.
- Li, J., Z. B. Wu, Z. Zhang, J. W. Zha, S. Y. Qu, X. Z. Qi, G. X. Wang y F. Ling. 2019. **Effects of potential probiotic *Bacillus velezensis* K2 on growth, immunity and resistance to *Vibrio harveyi* infection of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂ × *E. fuscoguttatus*♀).** *Fish and Shellfish Immunology* 93: 1047-1055.
- Mehrim A. I. 2009. **Effect of Dietary Supplementation of Biogen (Commercial Probiotic) on Mono-Sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Different Stocking Densities.** *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 4: 261-273.
- Mohammadian, T., M. Nasirpour, M. R. Tabandeh, A. A. Heidary, R. Ghanei-Motlagh y S. S. Hosseini. 2019. **Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection.** *Fish and Shellfish Immunology* 86: 269-279.
- Mohapatra, S., T. Chakraborty, A. K. Prusty, K. Paniprasad y K. N. Mohanta. 2012. **Use of different microbial probiotics in the diet of Rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora.** *Aquaculture Nutrition* 18: 1-11.
- Mukherjee, A., G. Chandra y K. Ghosh. 2019. **Single or conjoint application of autochthonous *Bacillus* strains as potential probiotics: Effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton).** *Aquaculture* 512: 1-15.
- Munirasu, S., V. Ramasubramanian y P. Arunkumar. 2017. **Effect of Probiotics diet on growth and biochemical performance of freshwater fish *Labeo rohita* fingerlings.** *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5 (3): 1374-1379.
- Nguyen, N. V., S. Onoda, T. V. Khanh, P. D. Hai, N. T. Trung, L. Hoang y S. Koshio. 2019. **Evaluation of dietary Heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 supplementation on growth performance, immunity and stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Aquaculture* 498: 371-379.
- Panigrahi, A., V. Kiron, T. Kobayashi, J. Puangkaew, S. Satoh y H. Sugita. 2004. **Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136.** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 379-388.
- Pieters, N., J. Brunt, B. Austin y A. R. Lyndon. 2008. **Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum).** *Journal of Applied Microbiology* 105: 723-732.
- Pourgholam, M. A., H. Khara, R. Safari, M. A. Yazdani-Sadati y M. Sadegh Aramli. 2015. **Dietary Administration of *Lactobacillus plantarum* Enhanced Growth Performance and Innate**

- Immune Response of Siberian Sturgeon, *Acipenser baerii*. Probiotics and Antimicrobial Proteins.** DOI 10.1007/s12602-015-9205-7.
- Robertson, P., C. O'dowd, C. Burrells, P. Williams y B. Austin. 2000. **Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum).** *Aquaculture* 185: 235-243.
- Standen, B. T., M. D. Rawling, S. J. Davies, M. Castex, A. Foey, G. Gioacchini, O. Carnevali y D. L. Merrifield. 2013. **Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Fish & Shellfish Immunology* 35: 1097-1104.
- Standen, B. T., A. Rodiles, D. L. Peggs, S. J. Davies, G. A. Santos y D. L. Merrifield. 2015. **Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 8403-8417.
- Taoka, Y., H. Maeda, J. Jo, M. Jeon, S. C. Bai, W. Lee, K. Yuge y S. Koshio. 2006. **Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system.** *Fisheries Science* 72: 310-321.
- Valipour, A. R., S. N. Hamedi y B. H. Abdollahpour. 2016. **Effects of probiotic (*Pediococcus acidilactici*) on growth and survival of kutum (*Rutilus kutum*) fingerlings.** *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 17: 35-46.
- Vendrell, D., J. L. Balcázar, I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Gironés y J. L. Múzquiz. 2008. **Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria.** *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 31: 337-345.
- Vieira de Moraes, A., M. De Oliveira Pereira, K. N. Moraes, J. P. Rodrigues-Soares, G. F. Alves Jesus y A. Jatobá. 2018. **Autochthonous probiotic as growth promoter and immunomodulator for *Astyanax bimaculatus* cultured in water recirculation system.** *Aquaculture Research* 49: 2808-2814.
- Wang Y. y Z. Xu. 2006. **Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities.** *Animal Feed Science and Technology* 127: 283-292.
- Wu, Z. X., X. Feng, L. L. Xie, X. Y. Peng, J. Yuan y X. X. Chen. 2012. **Effect of probiotic *Bacillus subtilis* Ch9 for grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora.** *Journal of Applied Ichthyology* 28: 721-727.
- Xia, Y., M. Lu, G. Chen, J. Cao, F. Gao, F. Wang, Z. Liu, H. Zhu y M. Yi. 2018. **Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease**



- resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. doi: 10.1016/j.fsi.2018.03.020.
- Xu, Y. J., Y. B. Wang y J. D. Lin. 2014. Use of *Bacillus coagulans* as a Dietary Probiotic for the Common Carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of World Aquaculture Society* 45: 403-411.
- Zhang, C., J. Zhang, W. Fan, M. Huang y M. Liu. 2019. Effects of dietary *Lactobacillus delbrueckii* on growth performance, body composition, digestive and absorptive capacity, and gene expression of common carp (*Cyprinus carpio* Huanghe var). *Aquaculture Nutrition* 25: 166-175.

### Referencias estudios de simbióticos

- Ai, Q., H. Xu, K. Mai, W. Xu, J. Wang y W. Zhang. 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture* 317: 155-161.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.036>
- Dawood, M. A. O., N. M. Eweedah, E. M. Moustafa y M. G. Shahin. 2019. Synbiotic Effects of *Aspergillus oryzae* and  $\beta$ -Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. doi:10.1007/s12602-018-9513-9
- Geng, X., X.-H. Dong, B.-P. Tan, Q.-H. Yang, S.-Y. Chi, H.-Y. Liu y X.-Q. Liu. 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish & Shellfish Immunology* 31(3): 400-406. doi:10.1016/j.fsi.2011.06.006
- González-Félix, M.L., D. M. Gatlin, P. Urquidez-Bejarano, C. de la Reé-Rodríguez, L. Duarte-rodríguez, F. Sánchez, A. Casas-reyes, F. Y. Yamamoto, A. Ochoa-Leyva y M. Pérez-Velázquez. 2018. Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 491: 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.031>
- Hardi, E. H., R. A. Nugroho, R. Rostika, C. M. Mardiyaha, K. Sukarti, W. Rahayu, A. Supriansyah y G. Saptiani. 2022. Synbiotic application to enhance growth, immune system, and disease resistance toward bacterial infection in catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 549: 737794. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737794>
- Kazuń, B., J. Małaczewska, K. Kazuń, R. Kamiński, D. Adamek-Urbańska y J. Żylińska-Urban. 2020. Dietary administration of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan and *Lactobacillus plantarum* improves innate immune response and increases the number of intestine immune cells in roach (*Rutilus rutilus*). *BMC Veterinary Research* 16(1): 216 <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02432-1>

- Mohammadi, G., M. Hafezieh, A. A. Karimi, M. N. Azra, H. Van Doan, W. Tapingkae, H. A. Abdelrahman y M. A. O. Dawood. 2022. **Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas hydrophila***. *Fish & Shellfish Immunology* 120: 304-313. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.11.028>
- Mouriño, J. L. P., F. do Nascimento Vieira, A. B. Jatobá, B. C. da Silva, G. F. A. Jesus, W. Q. Seiffert y M. L. Martins. 2012. **Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp)**. *Aquaculture Nutrition* 18: 73-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00879.x>
- Rodríguez-Estrada, U., S. Satoh, Y. Haga y H. J. S. Fushimi. S., 2009. **Effects of Single and Combined Supplementation of *Enterococcus faecalis*, Mannan Oligosaccharide and Polyhydroxybutyrate Acid on Growth Performance and Immune Response of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss***. *Aquaculture Science* 57: 609-617. <https://doi.org/10.11233/Aquaculturesci.57.609>
- Rodriguez-Estrada, U., S. Satoh, Y. Haga, H. Fushimi y J. Sweetman. 2013. **Effects of inactivated enterococcus faecalis and mannan oligosaccharide and their combination on growth, immunity, and disease protection in rainbow trout**. *North American Journal of Aquaculture* 75: 416-428. <https://doi.org/10.1080/15222055.2013.799620>
- Sewaka, M., C. Trullas, A. Chotiko, C. Rodkhum, N. Chansue, S. Boonanuntanasarn y N. Pirarat. 2019. **Efficacy of synbiotic Jerusalem artichoke and *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented diets on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, immune parameters and protection against *Aeromonas veronii* in juvenile red tilapia (*Oreochromis* spp.)**. *Fish & Shellfish Immunology*. doi:10.1016/j.fsi.2018.11.026
- Sutriana, A., M. N. Akter, R. Hashim y S. A. Mohd Nor. 2021. **Effectiveness of single and combined use of selected dietary probiotic and prebiotics on growth and intestinal conditions of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage, 1978) juvenile**. *Aquaculture International* 29: 2769-2791. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00777-4>
- Ye, J. D., K. Wang, F. D. Li, y Y. Z. Sun. 2011. **Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus***. *Aquaculture Nutrition* 17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00863.x>



**Anexo 2. Tablas de muestreo de peces blancos *Chirostoma estor* adultos recolectados en diferentes ambientes de desarrollo.**

**Tabla de muestreo de peces blancos recolectados en el Lago de Pátzcuaro (LP).**

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del Intestino total (incluye digesta) (g)	Tamaño del intestino (cm)
1	M	28.5	15.5	-	-
2	H	27.2	15.6	0.6	7.5
3	M	25.2	14.5	1.7	6.5
4	-	11	12	0.2	4
5	-	23.5	14.3	0.7	8.5
6	-	13.3	16.2	0.7	8.5
7	-	12.5	11.3	0.3	4.5
8	-	33.3	17.3	0.8	5.8
9	-	15.5	12	0.2	8
10	-	28	15.8	-	-
11	-	20.7	14.5	1.9	9
12	-	23.4	16	1	5
13	-	24.4	15	2.2	10

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

**Tabla de muestreo de peces blancos recolectados en Cultivo Intensivo (C).**

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del Intestino total (incluye digesta) (g)	Tamaño del intestino (cm)
1	H	52	15.5	1	9
2	H	37	15.5	1	5
3	-	30	15	-	3.5
4	M	35	15.8	0.64	4.5
5	-	31	15.3	1.5	8
6	H	42	17.2	0.7	5.5
7	-	32	16	1.5	8
8	H	33	15.3	1	6.5
9	-	31	15.3	-	8.3
10	M	43	17	0.9	6.2
11	-	35	15.5	1.1	7.8



12	M	37	16.3	0.5	5.2
13	H	45	17.5	2.2	11
14	H	36.9	15.8	0.5	5.8
15	M	40	16	1	10
16	M	24.8	14.5	0.6	5.8
17	H	51.2	18.3	2.1	12
18	M	36.1	15.5	1.2	8.2
19	M	27.5	15	1.2	8
20	H	36.2	14.5	0.8	6.8

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

**Tabla de muestreo de peces blancos recolectados en Cultivo Extensivo (E).**

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del Intestino total (incluye digesta) (g)	Tamaño del intestino (cm)
1	M	20.5	14.5	0.4	6.5
2	M	18.1	14	0.5	6
3	-	31.7	17	0.8	10
4	H	28.6	16.5	0.8	7.4
5	H	19.2	13.5	0.5	10.3
6	H	20.4	14.8	0.3	4.5
7	H	21	14.5	0.7	8
8	M	21	14.9	0.4	7.8
9	-	17.4	14	0.5	9
10	H	19	14.2	0.5	8.2
11	-	18.1	14	0.3	10
12	M	21	14.5	0.3	7.2
13	-	20.4	14.3	0.6	9.5
14	H	21.6	14.6	0.4	8.4
15	-	21.9	15	0.5	9.5
16	M	16.9	13.4	-	6.4
17	-	18.9	14.5	0.6	9
18	H	14	13	0.4	7.5
19					
20	M	16.7	13	0.4	11

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

**Anexo 3. Extracción de ADN por CTAB.**

1. Colocar las muestras en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL.
2. Agregar 480  $\mu$ L de EDTA 0.5 M y 120  $\mu$ L de lisozima (100 mg/mL), incubar a 37°C por 30 min, posteriormente centrifugar por 2 min a 15,000 rpm, una vez realizado lo anterior tirar el sobrenadante.
3. Agregar 350  $\mu$ L de buffer CTAB a cada tubo.
4. Agregar 20  $\mu$ L de proteinasa K en una concentración de 20 mg/mL y agitar brevemente.
5. Colocar los tubos en un termoblock a 55°C hasta que el tejido este lo suficientemente digerido.
6. Agregar 300  $\mu$ L de LiCl 5M, 5  $\mu$ L de RNAsa y agitar por un minuto; posteriormente agregar 600  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitar brevemente.
7. Agitar la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente.
8. Extraer 500  $\mu$ L de la capa acuosa (parte superior) del centrifugado y transferir a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL.
9. Añadir 50  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 mL de Etanol 100% frio; agitar y colocar a -20°C por 1 hora aproximadamente.
10. Centrifugar durante 20 min a 13,000 rpm a 4°C y retirar el sobrenadante cuidadosamente para no perder el ADN sedimentado.
11. Agregar 750  $\mu$ L de etanol al 70%, agitar por 15 min a temperatura ambiente, enseguida centrifugar a máxima velocidad (14,000 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente y retirar el sobrenadante por decantación.
12. Secar el pellet de ADN en una campana de flujo laminar, una vez seco, añadir entre 50 y 100  $\mu$ L de buffer TE (dependiendo del tamaño del pellet) para resuspender el pellet, durante 30 min a temperatura ambiente.
13. Calentar los tubos a 95°C por 5 minutos e inmediatamente colocar en hielo.
14. Guardar las muestras a -20°C.

**Anexo 4. Muestreo (muestra representativa de la población) de peces blancos antes de iniciar el experimento de prebióticos y simbióticos.**

No. de muestra	Peso del pez (g)	Talla (cm)
1	7.3	10
2	6	9.7
3	6.1	9.6
4	7	9.4
5	3.4	7.8
6	6.5	9.8
7	4.9	8.8
8	3.4	7.5
9	3.6	8
10	10	11
11	7	9.8
12	6.5	10
13	4.8	9
14	10.5	7.9
15	6.7	10
16	8.3	10.4
17	9.4	10.5
18	8	10.3
19	5.6	9.6
20	4.9	9
21	6.4	10
22	3.7	7.8
23	4.1	8.5
24	7.3	10.2
25	5	9
26	8.2	10.5
27	8.3	11
28	4.9	9.5
29	6.9	10
30	5.6	9
31	6.2	9.5
32	4.8	9
33	7.7	10.6

34	6.8	10
35	11	12
36	4.7	9
37	6.4	9.7
38	7.1	10
39	7.6	10.5
40	4.6	9.5
41	6.3	10
42	3.9	7.5
43	8	10.5
44	8.4	11
45	5.9	9
46	4.2	9
47	4.3	8.8
48	4.2	8.9
49	4.5	9
50	3.1	7.8
51	7.7	10
52	3.4	8
53	3.2	7.1
54	6.9	10.3
55	4	8.7
56	5.2	9.5
57	10.6	11.7
58	5.3	9.2
59	5.2	9.4
60	6.6	10.3
61	4.3	8.2
62	4.4	8.6
63	6.6	10.3
64	9.4	11.5
65	4.4	8.7
66	8.3	10.9
67	6.5	10.3
68	3.3	7
69	5.7	9.9

70	6.5	10.3
71	3.4	7.4
72	3	7.6
73	9.3	11.5
74	6.1	9.7
75	5	8.8
76	9.3	11
77	5.1	9.3
78	4.4	9
79	4.1	8.1
80	5.6	9.4
81	3.8	8.3
82	4.1	8.6
83	4	8.2
84	8	10.2
85	5.6	9.5
86	3.4	8
87	4.5	8.6
88	5.3	9.4
89	4.9	9
90	5.9	9.7
91	3.8	8
92	8.2	10.6
93	7.7	10.1
94	4.5	9.1
95	4.5	8
96	3.1	7.8
97	4	8.7
98	3.6	7.5
99	3.1	7.9
100	4.6	8.7
101	4	7.9
102	4.3	8.9
103	6.9	9.8
104	3	7.9
105	4.8	8.8



106	5.5	9.1
107	6.1	9.5
108	5.4	9
109	4.6	8.9
110	4.5	8.8
111	5.6	9.2
112	6.5	10.2
113	3.7	8.2
114	5.7	10.2
115	10.1	11.5
116	3.3	7.8
117	2.5	7.6
118	2.8	7.6
119	5.4	9.4
120	5.8	9.4
121	3	7.6
122	3.5	7.9
123	7.7	10.2
124	4.6	8.9
125	4.8	8.5
126	5.4	9.3
127	4.2	8.8
128	4.4	8.4
129	3	8
130	4.9	8.8
131	3.6	7.4
132	5.2	9.3
133	4.2	8.5
134	4.9	9
135	4.6	8.8
136	4.2	8.5
137	4.3	7.8
138	4.3	9
139	6.5	9.6
140	7.6	10.5
141	4.8	8.4

142	3.5	7.8
143	4.9	8.9
144	5.7	9.5
145	3.6	7.8
146	4.1	8.5
147	8.1	10.6
148	6.7	11
149	5.7	9.1
150	4.9	9.2
151	5	8.7
152	6.3	9.7
153	5.7	9.4
154	7	10.2
155	9.4	10.8
156	7.9	10.5
157	5.1	9.3
158	4.7	9.1
159	7.5	10.2
160	12.9	12.5
161	4.6	9
162	5.3	9.3
163	5.1	9
164	6.8	10
165	3.7	8.2
166	5.9	9.3
167	5.1	8.6
168	5.3	8.7
169	7.5	10
170	10	11.4
171	8.2	10.7
172	3.5	7.7
173	5.6	9.2
174	7.6	10.3
175	4.6	9
176	5	9.1
177	6.4	9.5

178	4.6	9
179	4.6	8.5
180	4.4	8.7
181	11.1	11.3
182	5	8.7
183	3.9	8.5
184	9.8	11
185	3.8	7.9
186	3.8	7.5
187	3.5	7.1
188	3.2	7.7
189	5.1	9.3
190	6.6	9.9
191	5.6	8.7
192	5.2	9.1
193	4.3	8.8
194	7.2	10.5
195	4.3	8.5
196	6.2	9.6
197	5.3	9.2
198	8.1	10.6
199	4.2	8.5
200	4.5	8.8
201	5.5	9.5
202	7.2	10.3
203	8.4	10.4
204	5.1	9.1
205	4.7	8.5
206	5.4	9.2
207	5.5	9.3
208	6.5	9.3
209	4.5	8.6
210	6.8	9.8
211	4.8	9
212	8.8	10.8
213	4.5	8.9

214	6.7	9.8
215	4.4	8
216	3.8	8.9
217	5.1	8.5
218	7.3	9.6
219	6.7	10.5
220	5.4	9.5
221	4.6	8.7
222	6.9	9.9
223	3.5	8
224	3.3	7.9
225	6.4	9.4
226	3.7	8.5
227	4.6	8.7
228	8.9	11
229	5.7	9.2
230	3	7.6
231	3.9	8.1
232	6	9.6
233	6.4	9.6
234	4	8.6
235	4.2	8.6
236	7.8	10.5
237	3.3	8
238	3.7	8.4
239	3.9	8.6
240	5.8	9.7
241	7.5	10.2
242	9.6	11.6
243	7.8	10.4
244	5.9	9.5
245	7.9	10.4
246	7.7	10.2
247	4.8	9
248	4.5	8.6
249	7.5	10

250	4.1	8.7
251	4.9	9.4
252	11.4	12.1
253	5.3	9.5
254	5.3	9.5
255	7.8	10
256	10.5	11.6
257	4.7	9
258	5.3	9.2
259	5.1	8.8
260	4.1	8.7
261	6.6	9.9
262	5.8	9.1
263	6	9.2
264	4.2	8.6
265	4.8	8.8
266	4.1	8.5
267	2.4	7.8
268	10.6	11
269	4.8	9.4
270	5.9	9.5
271	2.6	7.2
272	5.6	9.4
273	7.4	10.2
274	4.1	8.2
275	6.6	10
276	4.4	8.9
277	6.2	9.7
278	4.9	9
279	5.2	9
280	6.2	9.6
281	3.4	7.8
282	5.7	9
283	6.7	10
284	3.5	8
285	4.7	8.5

286	5	9
287	6.8	9.8
288	4.7	8.9
289	6.6	9.7
290	6.5	9.8
291	3.7	8.3
292	6.9	10.2
293	4.7	9
294	5.8	9.5
295	4.5	8.4
296	2.8	7.5
297	5.5	9.4
298	4.6	8.7
299	3.3	7.8
300	5.1	9
301	8.9	11
302	3.8	8.4
303	5.2	9
304	4.8	9
305	5	9.2
306	6.8	9.2
307	4.5	8.7
308	9.7	8
309	6.1	9.7
310	4.7	8.6
311	6.5	10
312	4.3	8.7
313	5.3	9
314	6	9.4
315	3.8	8
316	9.1	10.9
317	5.2	9.2
318	6.5	9.5
319	6	9.2
320	6.2	9.7
321	4.6	8.8

322	4.8	9
323	4.9	8.7
324	6.7	9.5
<b>Promedio</b>	<b>5.6</b>	<b>9.2</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>1.8</b>	<b>1.0</b>

**Anexo 5. Composición proximal de ingredientes utilizados para la formulación de dietas de prebióticos y simbióticos (% de materia húmeda  $\pm$  DE).**

<b>Ingrediente</b>	<b>Humedad</b>	<b>Ceniza</b>	<b>Lípido</b>	<b>Proteína</b>
Harina de pescado	5.27 $\pm$ 0.19	20.34 $\pm$ 0.08	10.30 $\pm$ 0.04	62.68 $\pm$ 0.47
Harina de Krill	5.84 $\pm$ 0.03	8.66 $\pm$ 0.01	23.27 $\pm$ 0.39	53.59 $\pm$ 0.83
Suero de leche	2.06 $\pm$ 0.42	7.42 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.11	8.89 $\pm$ 0.08
Proteína de soya	4.23 $\pm$ 0.04	5.61 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.05	84.87 $\pm$ 0.13
Albúmina	4.27 $\pm$ 0.17	6.16 $\pm$ 0.14	0.40 $\pm$ 0.35	84.84 $\pm$ 0.13



**Anexo 6. Tablas de muestreo de peces blancos *Chirostoma estor* juveniles recolectados en la semana 12 del experimento de prebióticos y simbióticos.**

**Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento testigo (C) réplica 1.**

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	M	10.6	12.1	0.2	5.5	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	9.2	11.2	0.2	4.5	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	9.3	11.6	0.2	4.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	M	8	10.8	0.2	5.5	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	H	9.2	11.4	0.2	6.3	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	H	11.9	11.6	0.3	6.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	M	11.6	12.1	0.2	5.5	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	H	20.8	14.5	0.6	6.7	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	8	10.6	0.2	4.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	H	11.7	12.1	0.2	6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	M	14.4	12.7	0.3	5.9	0.2	Morfología intestinal
12	M	9.5	11.5	0.2	5.4	0.2	Enzimas digestivas
13	M	11.4	11.8	-	-	0.2	Enzimas digestivas
14	H	13.7	13	0.3	6	0.2	Morfología intestinal
15	H	9.3	11.7	0.2	5.8	0.2	Morfología intestinal
16	H	18	13.8	0.5	-	0.3	Enzimas digestivas
17	-	14.3	12.6	-	-	-	Análisis proximal
18	-	12	12.3	-	-	-	Análisis proximal
19	-	9.7	10.7	-	-	-	Análisis proximal
20	-	13	12.8	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento testigo (C) réplica 2.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	H	10.4	11.7	0.2	5.1	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	8	10.9	0.2	5.1	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	10.5	11.6	0.2	4.8	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	M	8.9	11.5	0.2	4	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	M	8.7	11.2	0.2	4.3	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	H	9.6	11.2	0.2	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	M	7.3	10.6	0.2	4.2	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	H	11.4	12.2	0.2	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	10.1	11.7	0.2	6.0	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	M	10	11.9	0.3	3.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	M	10	11.7	0.2	5.8	0.2	Morfología intestinal
12	M	9.2	11.3	0.2	5.4	0.2	Morfología intestinal
13	M	11.2	11.8	0.2	5.9	0.1	Morfología intestinal
14	M	13.1	12.3	0.3	4.8	0.2	Enzimas digestivas
15	H	11.8	11.7	0.2	5.9	0.2	Enzimas digestivas
16	H	12.5	12.4	-	-	0.2	Enzimas digestivas
17	-	13.7	12.5	-	-	-	Análisis proximal
18	-	11.2	11.8	-	-	-	Análisis proximal
19	-	8.3	11.2	-	-	-	Análisis proximal
20	-	9.7	11.4	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento testigo (C) réplica 3.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	M	12.6	11.8	0.2	5.0	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	12.1	12.1	0.2	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	H	13.1	12.5	0.2	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	M	12.7	12.7	0.2	5.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	H	10.3	11.5	0.2	4.9	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	M	10	11.7	0.2	4.5	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	M	13.5	12.7	0.3	5.9	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	M	11.5	12.3	0.2	5.4	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	11.9	12.2	0.2	7.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	H	13.3	12.3	0.4	5.0	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	H	15.3	12.9	0.2	4.9	0.1	Morfología intestinal
12	H	12.9	12.5	0.2	5.5	0.2	Morfología intestinal
13	M	10.5	11.9	0.2	4.6	0.2	Morfología intestinal
14	M	12.9	12	0.2	5.1	0.1	Enzimas digestivas
15	H	11.2	11.5	0.2	4.0	0.2	Enzimas digestivas
16	M	14.4	12.5	0.3	4.8	0.2	Enzimas digestivas
17	-	19.4	14	-	-	-	Análisis proximal
18	-	18.7	14	-	-	-	Análisis proximal
19	-	13.9	12.7	-	-	-	Análisis proximal
20	-	13.9	12.7	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento inulina (I) réplica 1.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	M	10.7	11.8	0.1	3.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	11.6	12.3	0.2	4.3	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	12.1	12.3	0.3	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	H	8.6	10.3	0.2	4.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	H	12	12	0.2	6.3	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	M	13.9	12.1	0.3	3.5	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	M	10.1	11.7	0.2	4.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	H	17	13.4	0.5	5.5	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	19.4	14	0.3	5.3	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	M	9.2	11.3	0.2	4.1	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	M	9.8	11.6	0.2	5.3	0.1	Morfología intestinal
12	M	9	11.4	0.2	-	0.1	Morfología intestinal
13	M	10.1	11.6	0.2	4.5	0.1	Morfología intestinal
14	M	11.7	12.1	0.3	4.0	0.1	Enzimas digestivas
15	M	9.2	11.3	0.2	5.8	0.1	Enzimas digestivas
16	H	14.5	12.6	0.3	4.0	0.1	Enzimas digestivas
17	-	12.2	11.7	-	-	-	Análisis proximal
18	-	10.9	11.9	-	-	-	Análisis proximal
19	-	9.8	11.5	-	-	-	Análisis proximal
20	-	8.4	10.7	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento inulina (I) réplica 2.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	M	11.3	12.2	0.2	5.4	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	H	10.7	12	0.2	4.5	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	H	14.3	12.7	0.3	6.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	H	8.8	11.4	0.2	5.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	M	11.3	12	0.3	6.3	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	M	12.9	12.1	0.3	6.5	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	H	15.4	12.7	0.3	6.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	M	14	12.7	0.3	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	13.5	12.5	0.3	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	M	9.7	11.6	0.2	7.0	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	M	15.1	13.2	0.3	-	0.2	Morfología intestinal
12	H	11.6	12.2	0.2	5.6	0.2	Morfología intestinal
13	H	9.2	10.9	0.2	5.3	0.1	Morfología intestinal
14	H	13.1	12.9	0.4	6.0	0.2	Enzimas digestivas
15	H	10	15.5	0.2	5.0	0.1	Enzimas digestivas
16	-	10.6	11.3	0.3	4.2	0.2	Enzimas digestivas
17	-	11.4	11.8	-	-	-	Análisis proximal
18	-	9.6	11.4	-	-	-	Análisis proximal
19	-	10.8	11.7	-	-	-	Análisis proximal
20	-	11.6	12	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento inulina (I) réplica 3.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	H	12	12.3	0.2	4.1	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	10.8	11.8	0.2	5.5	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	14.6	12.3	0.2	6.1	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	H	11.1	11.9	0.2	4.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	M	17.9	13.5	0.3	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	M	17	12.8	0.4	6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	H	21.2	14.8	0.6	5.5	0.4	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	M	16.3	12.9	0.4	5	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	13.7	12.3	0.2	6.2	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	H	11.5	12.3	0.2	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	H	10.4	11.6	0.3	5.4	0.2	Morfología intestinal
12	H	16.6	13.2	0.5	5.3	0.3	Morfología intestinal
13	H	10.3	11.8	0.2	5.5	0.1	Morfología intestinal
14	M	10.7	11.5	0.3	5.6	0.2	Enzimas digestivas
15	H	7.4	10.2	0.2	3.6	0.2	Enzimas digestivas
16	H	9.5	11.5	0.3	4.2	0.2	Enzimas digestivas
17	-	13.9	12.3	-	-	-	Análisis proximal
18	-	10.9	11.8	-	-	-	Análisis proximal
19	-	8.4	10.8	-	-	-	Análisis proximal
20	-	11.9	12.4	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento pared celular (P) réplica 1.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	M	18.4	14.1	0.4	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	H	13.7	12.3	0.4	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	12.4	12.4	0.2	5.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	M	15	13.3	0.2	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	M	10	11.5	0.2	4.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	M	13.1	12.6	0.3	5.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	H	11	12.2	0.3	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	H	15.2	12.9	0.2	4.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	15.7	13.3	0.2	5.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	-	14.4	12.7	0.3	5.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	H	13.6	12.4	0.3	4.9	0.2	Morfología intestinal
12	H	19.4	13.9	0.4	5.8	0.3	Morfología intestinal
13	H	22.3	14.4	0.5	6.4	0.3	Morfología intestinal
14	M	22.5	14.6	0.3	6.2	0.3	Enzimas digestivas
15	H	17.7	13.7	0.4	5.7	0.3	Enzimas digestivas
16	M	14.4	13.2	0.3	5.4	0.2	Enzimas digestivas
17	-	15.8	13.2	-	-	-	Análisis proximal
18	-	11.5	12	-	-	-	Análisis proximal
19	-	11.4	12.1	-	-	-	Análisis proximal
20	-	12.4	12	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento pared celular (P) réplica 2.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	M	14.4	12.5	0.3	4.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	11.1	11.6	0.2	4.7	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	H	16.4	13.4	0.4	5.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	M	13.7	12.4	0.2	5.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	M	15.8	12.9	0.2	4.3	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	H	14.7	12.8	0.2	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	M	14.5	12.4	0.3	4.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	M	14.2	12.3	0.3	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	13.4	12.4	0.5	5.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	H	16.4	12.9	0.4	4.6	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	H	16.3	13.9	0.4	6.1	0.2	Morfología intestinal
12	M	17.1	13.4	0.3	5.4	0.2	Morfología intestinal
13	H	17.2	13.4	0.4	5.8	0.3	Morfología intestinal
14	H	13.3	12.4	0.4	5.0	0.3	Enzimas digestivas
15	M	16.6	13.3	0.3	5.3	0.2	Enzimas digestivas
16	H	17	13.6	0.5	5.8	0.3	Enzimas digestivas
17	-	13.9	12	-	-	-	Análisis proximal
18	-	13.9	12.2	-	-	-	Análisis proximal
19	-	10.1	11.5	-	-	-	Análisis proximal
20	-	14.9	12.8	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.



Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento pared celular (P) réplica 3.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	H	13	12.1	0.5	6.5	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	H	17.4	13.3	0.4	4.9	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	13.9	12.3	0.3	4.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	H	13.4	12.6	0.2	5.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	M	17.4	12.9	0.3	6.2	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	M	15.1	13	0.4	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	M	22.3	14.4	0.4	7.6	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	M	16.2	12.9	0.6	5.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	H	21.8	13.9	0.4	6.4	0.4	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	M	13.2	12.3	0.3	4.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	M	17	13	0.4	6.1	0.2	Morfología intestinal
12	M	20.4	14.1	0.5	6.6	0.2	Morfología intestinal
13	H	21.4	14.4	0.5	7.9	0.4	Morfología intestinal
14	H	21.1	14.2	0.5	7.8	0.4	Enzimas digestivas
15	M	18.8	13.4	0.4	6.0	0.2	Enzimas digestivas
16	M	12.9	12	0.3	5.0	0.2	Enzimas digestivas
17	-	14.8	12.3	-	-	-	Análisis proximal
18	-	14.1	12.4	-	-	-	Análisis proximal
19	-	14.2	12.5	-	-	-	Análisis proximal
20	-	12.9	12	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento *Lactobacillus acidophilus* + inulina (L+I) réplica 1.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	M	15.3	13.1	0.3	5.9	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	17.3	13.2	0.4	5.1	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	19.7	13.6	0.4	6.8	0.4	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	M	14.2	13	0.2	4.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	H	13.5	12.6	0.2	4.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	H	16.1	13.2	0.5	4.5	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	H	17	13.2	0.3	6.0	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	M	15.6	13.1	0.3	5.1	0.4	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	H	17.7	13.3	0.4	5.9	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	H	14.3	13.1	0.3	4.1	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	M	24.6	14.5	0.5	6.5	0.5	Morfología intestinal
12	M	20	13.8	0.5	6.9	0.4	Morfología intestinal
13	M	16.3	12.8	0.3	5.1	0.3	Morfología intestinal
14	M	15.6	13	0.3	5.4	0.2	Enzimas digestivas
15	H	19.6	13.9	0.5	5.9	0.4	Enzimas digestivas
16	H	21.5	14.4	0.3	4.9	0.4	Enzimas digestivas
17	-	22.5	14	-	-	-	Análisis proximal
18	-	15.9	13.5	-	-	-	Análisis proximal
19	-	15.7	13	-	-	-	Análisis proximal
20	-	13.4	13	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento *Lactobacillus acidophilus* + inulina (L+I) réplica 2.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	H	18.7	13.9	0.4	5.7	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	H	19.7	14	0.3	5.3	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	16.2	13.2	0.3	5.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	H	17.3	13.3	0.4	5.7	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	H	17.6	13.4	0.3	5.0	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	H	16.5	13.6	0.2	5.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	M	15.2	13.1	0.3	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	H	16.1	13.1	0.4	6.8	0.4	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	H	16.3	13.4	0.3	5.5	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	M	20.9	14.2	0.5	6.9	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	H	15.7	13.5	0.3	5.6	0.2	Morfología intestinal
12	H	22.7	14.9	0.5	6.5	0.3	Morfología intestinal
13	M	18.1	13.4	0.3	5.4	0.2	Morfología intestinal
14	H	22.8	14.5	0.6	6.0	0.4	Enzimas digestivas
15	M	19.3	13.5	0.4	5.6	0.2	Enzimas digestivas
16	M	17.6	13.4	0.3	5.2	0.2	Enzimas digestivas
17	-	17.3	13.7	-	-	-	Análisis proximal
18	-	17.8	13.5	-	-	-	Análisis proximal
19	-	17.1	13.5	-	-	-	Análisis proximal
20	-	18.5	13.9	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento *Lactobacillus acidophilus* + inulina (L+I) réplica 3.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	H	17.1	13.3	0.2	4.4	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	13.5	12.7	0.2	5.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	17.1	13.3	0.2	4.2	0.1	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	M	19.9	14.3	0.2	4.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	H	16	12.9	0.2	4.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	M	20.9	19.3	0.2	4.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	H	17	12.8	0.2	4.5	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	M	13.7	12.4	0.3	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	16.1	12.8	0.3	4.2	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	H	17.6	13.5	0.3	4.0	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	H	18.1	14.1	0.2	5.1	0.1	Morfología intestinal
12	M	19.7	13.8	0.2	4.4	0.1	Morfología intestinal
13	M	19	13.6	0.2	5.0	0.1	Morfología intestinal
14	H	14.5	12.8	0.3	5.3	0.2	Enzimas digestivas
15	M	20.4	14.5	0.3	5.7	0.1	Enzimas digestivas
16	M	17.5	13.5	0.2	4.5	0.1	Enzimas digestivas
17	-	21	14.4	-	-	-	Análisis proximal
18	-	19.3	13.6	-	-	-	Análisis proximal
19	-	17	13.7	-	-	-	Análisis proximal
20	-	18.2	13.9	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento *Lactobacillus acidophilus* + pared celular (L+P) réplica 1.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	H	18.4	13.8	0.3	5.7	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	13.9	13.1	0.2	4.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	H	13.2	13	0.3	4.3	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	H	25.8	15.4	0.5	5.8	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	M	20.8	14	0.6	5.6	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	H	17.8	14	0.3	5.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	H	16.2	13	0.2	3.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	H	18.7	13.8	0.4	5.4	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	H	21.2	14.5	0.4	6.4	0.4	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	-	24.1	15.1	0.5	6.4	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	H	22.3	14.6	0.5	6.7	0.3	Morfología intestinal
12	H	18.2	13.9	0.5	6.8	0.3	Morfología intestinal
13	H	19.9	14	0.4	6.2	0.3	Morfología intestinal
14	M	24.6	14.8	0.5	6.2	0.2	Enzimas digestivas
15	H	14.7	13.2	0.3	5.1	0.2	Enzimas digestivas
16	H	18.4	13.7	0.4	6.8	0.3	Enzimas digestivas
17	-	14.8	13	-	-	-	Análisis proximal
18	-	15.9	13.1	-	-	-	Análisis proximal
19	-	16.5	13.2	-	-	-	Análisis proximal
20	-	18.9	13.5	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento *Lactobacillus acidophilus* + pared celular (L+P) réplica 2.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	H	20.1	14.3	0.5	6.8	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	M	16.6	13.3	0.2	5.3	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	M	17.3	13.2	0.4	5.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	H	17.2	13.5	0.4	5.6	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	H	24.3	15.3	0.6	4.8	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	M	19	14.3	0.3	5.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	H	18.1	14	0.4	5	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	H	12.9	13	0.3	4.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	M	17.4	13	0.3	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	M	12.6	13	0.2	4.2	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	H	25.8	15.4	0.6	5.5	0.4	Morfología intestinal
12	M	16.3	13.1	0.3	4.3	0.2	Morfología intestinal
13	H	17.3	14	0.3	5.8	0.4	Morfología intestinal
14	M	16.6	13.2	0.3	5.8	0.3	Enzimas digestivas
15	H	15	13.2	0.4	5.4	0.3	Enzimas digestivas
16	M	14.2	13	0.3	4.8	0.2	Enzimas digestivas
17	-	13.2	13	-	-	-	Análisis proximal
18	-	12.3	13.2	-	-	-	Análisis proximal
19	-	13.9	13	-	-	-	Análisis proximal
20	-	13.4	14.2	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.

Tabla de muestreo de peces blancos del tratamiento *Lactobacillus acidophilus* + pared celular (L+P) réplica 3.

No. de muestra	Sexo (M o H)	Peso del pez (g)	Talla (cm)	Peso del intestino (g)	Talla del intestino (cm)	Peso del hígado (g)	Uso (objetivo respectivo de la muestra)
1	H	18	13.9	0.3	4.3	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
2	H	12.5	13	0.5	6.8	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
3	H	19.5	14.6	0.4	5.2	0.3	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
4	M	16.5	13.5	0.3	4.6	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
5	M	17	13.5	0.4	5.1	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
6	H	16.6	13.4	0.3	6.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
7	M	16.1	13	0.4	5.1	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
8	H	14.6	13	0.5	5.2	0.4	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
9	H	12.9	13	0.3	5.4	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
10	M	14.1	13.2	0.3	5.9	0.2	Metagenómica, metabolómica, transcriptómica, ácidos grasos
11	M	13.2	13	0.3	4.9	0.2	Morfología intestinal
12	H	21.3	14.3	0.5	6.4	0.4	Morfología intestinal
13	H	14.2	13	0.3	4.4	0.3	Morfología intestinal
14	M	15.3	13.2	0.3	5.7	0.2	Enzimas digestivas
15	H	14.2	13	0.3	5.1	0.2	Enzimas digestivas
16	M	11.9	13.4	0.2	4.5	0.2	Enzimas digestivas
17	-	13.5	13	-	-	-	Análisis proximal
18	-	14.7	13.2	-	-	-	Análisis proximal
19	-	14.4	13	-	-	-	Análisis proximal
20	-	16.2	13.5	-	-	-	Análisis proximal

**Nota:** El guión (-) dentro de las celdas de la tabla indica que el dato no se tomó por alguna razón pero si se tomó la muestra de pez.