



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

USO DE PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS EN LARVAS DE PESCADO BLANCO *Chirostoma estor* Y SU INFLUENCIA EN EL CRECIMIENTO Y MICROBIOTA INTESTINAL

TESIS QUE PRESENTA:

ING. MARICRUZ ÁLVAREZ ÁLVAREZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. LUCIANA RAGGI HOYOS



MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, OCTUBRE DE 2022

RESUMEN

Al igual que en el caso de muchas especies de peces, la larvicultura del Pez blanco (*Chirostoma estor*) se sustenta todavía en el uso de presas vivas como primera alimentación, a pesar de los esfuerzos orientados a la sustitución total o parcial del alimento vivo. La mayoría de las microdietas para larvas de peces desarrolladas hasta la fecha son deficientes, sin embargo existen suplementos dietéticos capaces de mejorar el crecimiento y supervivencia de los peces, además de conferirles beneficios en la salud, a través de la estimulación del sistema inmune y la modulación de su microbiota intestinal. En este trabajo, se probaron dos tipos de suplementos: prebióticos; inulina de agave (2%) y pared celular de levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) (0.025%), y un probiótico; *Lactobacillus acidophilus* (0.5%), así como una mezcla de ambos (simbióticos). Para ello se aplicaron nueve tratamientos de alimentación, de los cuales los dos primeros fungieron como controles; 1) alimento vivo rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y 2) microdieta sin suplementación. El resto de los tratamientos constaron de microdietas suplementadas; 3) microdieta + inulina, 4) microdieta + pared celular, 5) microdieta + pared celular + inulina, 6) microdieta + *L. acidophilus*, 7) microdieta + *L. acidophilus* + inulina, 8) microdieta + *L. acidophilus* + pared celular y 9) microdieta + *L. acidophilus* + inulina + pared celular, durante 32 días, en larvas de *C. estor*. Se evaluaron los efectos de estos aditivos en el crecimiento, supervivencia y microbiota intestinal, esta última caracterizada mediante secuenciación de nueva generación de la región V3 del gen ARNr 16S. Los datos obtenidos indican que la supervivencia no se vio alterada por los tratamientos de alimentación y sugieren que las larvas alimentadas con rotíferos, microdieta control y las suplementadas con pared celular y pared celular-inulina alcanzaron los mejores rendimientos en peso ($p < 0.05$). Por su parte, las comunidades microbianas estuvieron dominadas en más del 80% por los phyla Proteobacteria, Chloroflexi, Planctomycetota, Acidobacteria y Firmicutes, y por los géneros *Providencia*, *Nitrosomonas*, y miembros sin cultivar de la familia Xanthomonadacea; además se identificaron 73 géneros compartidos por todos los tratamientos, conformando estos una microbiota núcleo. La diversidad alfa no mostró diferencias significativas entre tratamientos; no obstante, se determinó que la microbiota intestinal se vio influenciada por la combinación de pared celular-inulina ($R = 0.319$, $p = 0.003$), aumentando diferencialmente la abundancia de dos taxones bacterianos benéficos; *Brevundimonas*, grupo productor de carotenoides como la astaxantina y *Achromobacter*, productoras de enzimas degradadoras de quitina y celulosa. Estos resultados constituyen un avance importante para la larvicultura y para el conocimiento de los efectos de estos suplementos en la microbiota de especies de peces agástricas como *C. estor*, sugiriendo estudios futuros orientados a dilucidar la funcionalidad de estas bacterias intestinales y a evaluar el costo-beneficio de la inclusión de pared celular-inulina en las dietas.

Palabras clave: larvicultura, alimento vivo, microdietas, suplementación dietética, microbiómica.

ABSTRACT

Like many species, Mexican pike silverside larviculture is based on the use of live prey as first food, despite efforts aimed at total or partial replacement of live food. Most microdiets developed to date are deficient, however there are dietary supplements capable of improving the growth and survival of the species, in addition to conferring health benefits through the stimulation of the immune system and the modulation of the intestinal microbiota of the host organism. In this work, two types of supplements were tested: prebiotics; agave inulin (2%) and cell wall of beer yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (0.025%), and a probiotic; *Lactobacillus acidophilus* (0.5%), as well as a mixture of both (symbiotics). For this, nine food treatments were applied, of which the first two served as controls; 1) Live food rotifers (*Brachionus plicatilis*) and 2) microdieta without supplementation. The rest of the treatments consist of supplemented microdietas; 3) microdieta + inulin, 4) microdieta + cell wall, 5) microdieta + cell wall + inulin, 6) microdieta + *L. acidophilus*, 7) microdieta + *L. acidophilus* + inulina, 8) microdieta + *L. acidophilus* + cell wall and 9) microdieta + *L. acidophilus* + inulina + cell wall, for 32 days, in larvae of *C. estor*. The effects of these additives on the growth, survival and intestinal microbiota were evaluated, the latter characterized by new generation sequencing of the V3 region of the ARNR 16S gene. The data obtained indicate that the survival was not altered by the food treatments and suggest that the larvae fed with rotifers, microdieta control and those supplemented with cell wall and cell wall-inulin reached the best yields by weight ($p < 0.05$). On the other hand, the microbial communities were dominated by more than 80% by the phyla Proteobacteria, Chloroflexi, Planctomycetota, Acidobacteria and Firmicutes, and by the genus *Providencia*, *Nitrosomonas*, and without cultivating members of the Xanthomonadacea family; In addition, 73 genus shared by all treatments were identified, forming these a microbiota core. Alpha diversity didn't show significant differences, however, it was determined that the intestinal microbiota was influenced by the cell wall-inulin combination ($R = 0.319$, $p = 0.003$), differentially increasing the abundance of two beneficial bacterial taxa; *Brevundimonas*, a group that produces carotenoids such as astaxanthin, and *Achromobacter*, chitin and cellulose-degrading enzymes. These results contribute for the advancement of larviculture knowledge and the implications of these supplements in the microbiota of agastric fish species such as *C. estor*, suggesting future studies should aim to elucidating the functionality of these intestinal bacteria and evaluating the cost-benefit of the inclusion of cell wall-inulin in diets.

Keywords: larviculture, live food, microdiets, dietary supplements, microbiomics.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quiero comenzar agradeciendo profunda y respetuosamente a todas las partes involucradas en todo este proyecto y durante mi estancia como estudiante del PIMCB.

En primer lugar, a mis directores; *Dra. Luciana Raggi* y *Dr. Carlos A. Martínez*, por todo el apoyo, la paciencia y los conocimientos brindados durante toda mi formación. A mi comité sinodal; *Dra. María Gisela Ríos*, *Dr. Cristián Martínez* y *Dr. Bruno Gómez-Gil*, por su experiencia y sus atinados aportes hechos al presente proyecto, y por supuesto al resto del equipo de investigadores, técnicos y alumnos que forman parte de la familia del *Laboratorio de Biotecnología Acuícola LANMDA-IIAF-UMSNH*.

A mis compañeros; a *Antonio Delgado*, por su amistad, compañerismo, valiosa ayuda y los momentos compartidos especialmente durante la fase experimental, a *Lupita Cortés* quién me inicio en el manejo larvario y hoy puedo llamarla amiga, a *Eduardo Martínez*, *Mateo Amillano* y *Perla Tzipani Rosas*, por su invaluable paciencia, disposición y apoyo en todo el presente proyecto, a *Tere Molinero* por su amistad y gran ayuda, a *Gilmar Souza*, *Lupita Pámanes* y *Lupita Joaquín* por compartir su tiempo, conocimientos y experiencias.

A *CONACYT* por el financiamiento que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Y finalmente aunque no menos importante, a mi amada familia.

Gracias a ustedes veo culminada esta etapa de mi vida, que quede plasmado que sin sus aportes nada de esto hubiera sido posible, mis agradecimientos más sinceros.

A mis pilares: mamá y papá

A mis hermanos

A mi familia de sangre y de amor

A mi familia por elección

A mi Elena

¡Los amo!

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| Índice de tablas | VIII |
| Índice de figuras | IX |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 Pescado blanco | 4 |
| 2.1.1 Historia y situación actual | 4 |
| 2.1.2 Características generales | 5 |
| 2.1.3 Primera alimentación | 5 |
| 2.2 Microdietas | 6 |
| 2.3 Suplementos dietéticos | 8 |
| 2.3.1 Probióticos | 8 |
| 2.3.2 Prebióticos | 10 |
| 2.4 Efectos de los probióticos y prebióticos en organismos acuáticos | 11 |
| 2.5 Microbiota intestinal | 12 |
| 2.5.1 Evaluación metagenómica de las comunidades bacterianas en peces | 13 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 15 |
| 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN | 16 |
| 5. HIPÓTESIS | 17 |
| 6. OBJETIVOS | 18 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 7.1 Evaluación de prebióticos y probióticos en el crecimiento y supervivencia de larvas de Pez blanco | 19 |
| 7.1.1 Descripción de la unidad experimental | 19 |
| 7.1.2 Larvas experimentales | 19 |
| 7.1.3 Diseño experimental y plan de alimentación | 20 |
| 7.1.5 Condiciones experimentales y manejo larvario | 21 |

| | |
|--|----|
| 7.1.6 Muestreos | 22 |
| 7.1.7 Estimación de parámetros productivos y supervivencia | 23 |
| 7.1.8 Análisis bromatológicos | 23 |
| 7.1.9 Análisis estadístico | 23 |
| 7.2 Evaluación de la microbiota intestinal utilizando prebióticos y probióticos en la dieta | 24 |
| 7.2.1 Muestreo y extracción de material genético microbiano del intestino de peces | 24 |
| 7.2.2 Secuenciación | 24 |
| 7.2.3 Análisis bioinformático | 25 |
| 7.2.4 Análisis estadístico y graficación | 25 |
| 8. RESULTADOS | 27 |
| 8.1 Análisis bromatológicos de las microdietas | 27 |
| 8.3 Desempeño larvario | 27 |
| 8.5 Microbiota intestinal | 30 |
| 8.5.1 Diversidad alfa | 30 |
| 8.5.2 Diversidad beta | 31 |
| 8.5.3 Composición de la microbiota | 33 |
| 8.5.4 Abundancia diferencial de taxones | 35 |
| 8.5.6 Microbiota única y compartida | 37 |
| 9. DISCUSIÓN | 39 |
| 9.1 Evaluación del efecto de las microdietas suplementadas con probióticos y prebióticos en el crecimiento y supervivencia | 39 |
| 9.2 Evaluación del efecto de los probióticos y prebióticos en la microbiota intestinal | 43 |
| 10. CONCLUSIONES | 49 |
| 11. RECOMENDACIONES | 50 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA | 51 |
| 13. ANEXOS | 61 |

| | |
|---|----|
| 13.1 Resultados más relevantes del uso de probióticos y prebióticos en organismos acuáticos | 61 |
| 13.2 Extracción de ADN por método CTAB | 64 |
| 13.3 Índices de diversidad alfa | 65 |
| 13.4 Phyla encontrados en mayor abundancia en la microbiota intestinal | 66 |
| 13.5 Géneros encontrados en mayor abundancia en la microbiota intestinal | 67 |
| 13.6 Géneros compartidos por todos los tratamientos de alimentación | 68 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Descripción de los tratamientos de alimentación evaluados en larvas de <i>C. estor</i> durante 32 días..... | 20 |
| Tabla 2. Plan de alimentación seguido durante los 32 días de experimentación. . | 21 |
| Tabla 3. Valores (promedio \pm desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el periodo experimental..... | 22 |
| Tabla 4. Composición proximal (promedio \pm desviación estándar) o de las microdietas utilizadas durante el experimento de alimentación. Índices diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). | 27 |
| Tabla 5. Peso ganado (%), tasa de crecimiento específico ($\% \text{ día}^{-1}$) y ganancia de peso individual (mg día^{-1}) (promedio \pm desviación estándar) de larvas de <i>C. estor</i> alimentadas durante 32 días con rotífero (<i>B. plicatilis</i>) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Índices diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). | 29 |
| Tabla 6. Resultados del análisis de varianza multivariante permutacional PERMANOVA Adonis correspondiente al NMDS Figura 8B. * Indica diferencias significativas ($p < 0.05$)..... | 33 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Sistema de recirculación de agua (A), distribución de las unidades experimentales (B) y unidad experimental (C). | 19 |
| Figura 2. Temperatura del agua (°C) registrada diariamente (promedio ± desviación estándar) durante el experimento de alimentación..... | 22 |
| Figura 3. Peso seco final de larvas de <i>C. estor</i> alimentadas durante 32 días con rotífero (<i>B. plicatilis</i>) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Índices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= <i>L. acidophilus</i> , LI= <i>L. acidophilus</i> - inulina, LW= <i>L. acidophilus</i> + pared celular, LWI= <i>L. acidophilus</i> - pared celular - inulina. | 28 |
| Figura 4. Longitud total final de larvas de <i>C. estor</i> alimentadas durante 32 días con rotífero (<i>B. plicatilis</i>) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Índices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= <i>L. acidophilus</i> , LI= <i>L. acidophilus</i> - inulina, LW= <i>L. acidophilus</i> + pared celular, LWI= <i>L. acidophilus</i> - pared celular - inulina. | 28 |
| Figura 5. Supervivencia (%) de larvas de <i>C. estor</i> alimentadas durante 32 días con rotífero (<i>B. plicatilis</i>) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos ($p = 0.0586$). Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= <i>L. acidophilus</i> , LI= <i>L. acidophilus</i> - inulina, LW= <i>L. acidophilus</i> + pared celular, LWI= <i>L. acidophilus</i> - pared celular - inulina. | 30 |
| Figura 6. Curvas de rarefacción de OTUs al 97% de identidad observadas en la microbiota intestinal de larvas de <i>C. estor</i> alimentadas durante 32 días con rotífero (<i>B. plicatilis</i>) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos..... | 30 |
| Figura 7. Alfa diversidad expresada en términos de los índices Chao1 y Shannon de la microbiota intestinal de larvas de <i>C. estor</i> alimentadas durante 32 días con rotífero (<i>B. plicatilis</i>) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Índices diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$). | 31 |
| Figura 8. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS distancias Bray-Curtis) de la microbiota intestinal de larvas de <i>C. estor</i> alimentadas durante 32 días con rotífero (<i>B. plicatilis</i>) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos, donde A) representación del total de los tratamientos y B) acercamiento al grupo observable en la figura A..... | 32 |

Figura 9. Abundancia relativa a nivel phylum de la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* + pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina. 34

Figura 10. Abundancia relativa a nivel género de la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* + pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina. 34

Figura 11. Phyla diferencialmente abundantes en la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos, determinados por un análisis discriminante lineal del tamaño del efecto (LEfSe) de todos los tratamientos de alimentación. Donde C= microdieta Testigo, LI= microdieta + *L. acidophilus* + inulina, LW= microdieta + *L. acidophilus* + pared celular y R= rotífero..... 35

Figura 12. Géneros diferencialmente abundantes en la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos, determinados por un análisis discriminante lineal del tamaño del efecto (LEfSe) de todos los tratamientos de alimentación. Donde C= microdieta control, LI= microdieta + *L. acidophilus* + inulina, LW= microdieta + *L. acidophilus* + pared celular, R= rotífero y WI= microdieta + pared celular + inulina. 36

Figura 13. Gráfico de intersecciones UpSet que representa los OTUS únicos y compartidos presentes en la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. 37

Figura 14. Gráfico de intersecciones UpSet que representa los géneros únicos y compartidos presentes en la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. 38

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha despertado un interés potencial en alimentos o aditivos funcionales que además de estimular el crecimiento y la supervivencia de los organismos también sean capaces de promover la salud y el bienestar de los mismos. Dentro de este amplio grupo encontramos a los probióticos y prebióticos, suplementos ampliamente utilizados en la nutrición humana y animal (Amenyogbe *et al.*, 2020; Guerreiro *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020).

Las oportunidades en esta área de estudio se derivan en gran parte de lo que podemos aprender sobre la influencia e interacción de estos aditivos con la microbiota intestinal y el huésped (Spacova *et al.*, 2020); sin embargo, los estudios enfocados en la microbiota intestinal de animales acuáticos se han visto eclipsados por las investigaciones realizadas en mamíferos y humanos (Bledsoe *et al.*, 2016; Egerton *et al.*, 2018).

Recientemente, Infante-Villamil *et al.* (2021) resaltan la importancia de desarrollar estrategias de gestión para preservar el equilibrio microbiano, incluido el mantenimiento o el aumento de la diversidad en el huésped. Una de las alternativas que ha tomado fuerza es el uso de suplementos dietarios como los probióticos y prebióticos, capaces de promover el crecimiento y supervivencia de las especies, además de estimular el sistema inmune y la resistencia a patógenos, a través de diferentes mecanismos entre los que destaca la modulación de la microbiota asociada a las especies (Ringø *et al.*, 2010, 2014; Song *et al.*, 2014; Ringø *et al.*, 2016; Amenyogbe *et al.*, 2020; Vargas-Albores *et al.*, 2021).

La microbiota, que abarca a toda la colección de microorganismos presentes en un ecosistema (Gibson *et al.*, 2017), en este caso el intestino, desempeña un papel integral en la salud y bienestar de los organismos, incluidos los peces, donde se relaciona fuertemente con la homeostasis energética, regulando procesos de alimentación, digestivos y metabólicos, además de estimular el desarrollo del sistema inmune y la respuesta a enfermedades (Tarnecki *et al.*, 2017; Butt & Volkoff, 2019). Su composición es el resultado de una compleja interacción de factores internos y externos como la etapa de desarrollo, nivel trófico, estación del año, ubicación geográfica, hábitat, fisiología digestiva,

manipulaciones dietéticas, entre muchos otros, siendo la dieta uno de los más estudiados (Bates *et al.*, 2006; Ringø *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Tarnecki *et al.*, 2017; Egerton *et al.*, 2018).

El modelo de estudio que proponemos en esta investigación es el pez blanco de Pátzcuaro, *Chirostoma estor*, un pez aterinópsido endémico de la meseta central de México, de gran importancia, debido entre otros factores a sus altos niveles de ácido docosahexaenoico (DHA) que lo convierten en una excelente fuente de ácidos grasos esenciales (Fonseca-Madrigal *et al.*, 2014; Martínez-Palacios *et al.*, 2020), sin embargo es una especie en peligro de desaparición (Martínez-Palacios *et al.*, 2002; Barriga-Sosa, 2018; Soto-Galera *et al.*, 2019) y aunque se cuenta con el ciclo completo de cultivo, éste sigue en fase experimental en laboratorio o como cultivo piloto, donde la nutrición en la etapa larvaria es la principal limitante (INAPESCA, 2018; Martínez-Palacios *et al.*, 2008).

Durante toda su vida, *C. estor* presenta un sistema digestivo con un intestino corto y carente de estómago o ciegos pilóricos. La primera alimentación del Pez Blanco se ha sustentado en el uso de presas vivas (Martínez-Palacios *et al.*, 2002, 2008; Ross *et al.*, 2006), sin embargo requiere de una mayor inversión en tiempo, espacio y recursos, lo que incrementa el costo productivo durante esta etapa (Cahu & Zambonino-Infante, 2001; Takeuchi *et al.*, 2003; Martínez-Palacios *et al.*, 2006). Es por ello que el desarrollo de dietas artificiales que puedan reemplazar al zooplancton vivo será un avance sustancial para la larvicultura y para la acuicultura en conjunto (Holt *et al.*, 2011).

Desde hace unos pocos años se determinó que la especie es capaz de consumir alimento balanceado en forma de microdietas desde el momento de la eclosión, no obstante el tiempo óptimo de destete se consigue hasta los 10 días post eclosión (Martínez-Ángeles, 2016).

Debido a lo anterior, se planteó suplementar las microdietas para esta especie con prebióticos, probióticos y una combinación de ambos, con énfasis en el desempeño de los peces y los efectos sobre la microbiota intestinal, haciendo uso de la metagenómica como herramienta de estudio. Todo esto en un intento por mejorar el crecimiento y supervivencia de la especie en etapa larvaria, a través de

cambios benéficos en la microbiota del intestino, además de aportar al conocimiento de los efectos de estos suplementos en la microbiota de una especie agástrica y de intestino corto. Si bien existen diversas investigaciones donde prueban estos componentes en peces sin estómago como el pez cebra (*Danio rerio*), principalmente se centran en los efectos inmunoestimulantes y no en los potenciales impactos sobre las comunidades microbianas asociadas a los organismos (López Nadal *et al.*, 2020).

2. ANTECEDENTES

2.1 Pescado blanco

2.1.1 Historia y situación actual

El Pescado blanco (*Chirostoma estor*), descrito inicialmente por Jordan en 1879 es una especie dulceacuícola miembro de la familia Atherinopsidae, nativa del Lago de Pátzcuaro y considerada como una de las especies endémicas icónicas de Pátzcuaro y de Michoacán, formando parte importante de la economía y cultura regional. Pese a su importancia, desde hace varios años se encuentra en riesgo de desaparición debido a múltiples factores como la contaminación del lago, pérdida de superficie y profundidad, la sobrepesca, y la introducción de especies exóticas, siendo la acuicultura la única vía de rescate y conservación (Martínez-Palacios *et al.*, 2002; Barriga-Sosa, 2018; Soto-Galera *et al.*, 2019).

Los primeros intentos de cultivo fueron realizados por De Buen en 1940, Solórzano en 1963 y Rosas-Moreno en 1970. Actualmente se cuenta con el ciclo de vida completo en cautiverio, sin embargo sigue en fase experimental en laboratorio o como cultivo piloto en granjas de producción con un nivel de dominio biotecnológico incompleto, siendo la nutrición en la etapa larvaria la principal limitante, donde todavía existe una fuerte dependencia del alimento vivo (INAPESCA, 2018; Martínez-Palacios *et al.*, 2008).

Es preciso profundizar el conocimiento en aspectos como la nutrición, genética, sanidad y prácticas de manejo para lograr cultivos semi-intensivos e intensivos de ciclo completo a escala comercial, priorizando la etapa larvaria donde se presentan altas mortalidades y que además requiere reducir los costos de producción ligados al uso de alimento vivo que encarece el proceso productivo (INAPESCA, 2018).

En los últimos años de investigación se ha logrado disminuir el tiempo de destete (Martínez-Ángeles, 2016), potenciar el crecimiento mediante el uso de fotoperiodos continuos (Corona-Herrera, 2017) e identificar, desde un enfoque nutrigenómico, las limitaciones de las microdietas desarrolladas para la especie frente al alimento vivo (Juárez-Gutiérrez *et al.*, 2021).

2.1.2 Características generales

Chirostoma estor es un organismo eurihalino, zooplanctófago filtrador, de cuerpo alargado con cabeza y boca pequeñas (21mm de apertura bucal máxima en adultos), en posición terminal y protractil con finos dientes unicúspides en la mandíbula y dientes faríngeos indicativos de un depredador pelágico que se alimenta de presas pequeñas (Ross *et al.*, 2006; Martínez-Palacios *et al.*, 2008).

Posee un tracto digestivo simple, carente de estómago y ciegos pilóricos, con intestino corto formado por tres regiones: anterior, posterior y recto. La longitud total del intestino en relación con la longitud corporal (longitud relativa del intestino: LRI) permanece constante hasta la edad adulta (LRI 0.3:1). Estas características sugieren que se alimenta continuamente de presas abundantes y de alta digestibilidad (Martínez-Palacios *et al.*, 2002, 2008; Ross *et al.*, 2006).

Es un organismo ovíparo cuyos huevos son transparentes, esféricos y pequeños de entre 0.9 y 1.2 mm con seis a ocho hilos adherentes. Las larvas eclosionan a los siete u ocho días post fertilización (a 25°C) y el saco vitelino desaparece al octavo día post eclosión (dpe) (Ríos-Durán *et al.*, 2016). Al eclosionar, las larvas miden entre 4.5 - 5 mm, son transparentes y poseen una línea de cromatóforos negros a lo largo del cuerpo, una vesícula biliar visible, así como una fuerte pigmentación ocular y gran desarrollo de los ojos, que se hace evidente en su capacidad de captura de presas desde el momento de la eclosión. No se ha definido con exactitud la duración del período larvario y se carece de conocimientos básicos acerca de los cambios funcionales y estructurales del aparato digestivo y del metabolismo de sus estadios tempranos (Martínez-Palacios *et al.*, 2002, 2006).

2.1.3 Primera alimentación

Al eclosionar, las larvas de *C. estor* exhiben una apertura de boca pequeña y una alta selectividad, es decir que solo consumen partículas de menor tamaño que su boca, debido a ello su larvicultura está sustentada en el uso de presas vivas (rotíferos pequeños) como primer alimento (Martínez-Palacios *et al.*, 2006).

Inicialmente se empleó el rotífero de agua dulce *Brachionus rubens*, no obstante se determinó que solo los neonatos eran aptos debido al tamaño de la boca de las larvas. Para eliminar la necesidad de clasificación, se optó por utilizar rotíferos marinos *B. plicatilis*, debido a su tamaño que oscila entre los 90-150 μm (Campos-Mendoza, 2000; Martínez-Palacios *et al.*, 2002, 2006), sin embargo investigaciones actuales indican que alcanza tamaños por encima de este rango (Mills *et al.*, 2017), lo que sigue haciendo necesario el uso de neonatos o machos.

A inicios de los 2000's las larvas se alimentaban durante los primeros 15 dpe con *B. plicatilis*, seguido de nauplios de *Artemia franciscana* hasta el día 30, cuando se daba inicio al destete con alimento artificial. Investigaciones siguientes lograron eliminar el uso de artemia durante esta etapa (Martínez-Palacios *et al.*, 2002). Más recientemente se redujo el tiempo de destete a 10 dpe y se comprobó que las larvas pueden consumir alimento artificial desde el momento de la eclosión, sin embargo, los resultados en cuanto a crecimiento y supervivencia no son óptimos (Martínez-Ángeles, 2016).

2.2 Microdietas

El crecimiento de la larvicultura intensiva y semi-intensiva de peces trajo consigo la necesidad de formas más eficientes de alimentar a los organismos (Holt *et al.*, 2011). Desde hace algunos años se han empleado dos estrategias para la alimentación de larvas de peces marinos: la primera basada en el uso de presas vivas como rotíferos, *Artemia* y copépodos, y la segunda mediante el desarrollo de dietas artificiales, principalmente microparticuladas (Lazo, 2000; Kolkovski, 2013).

Por lo general, se conoce como microdieta a la dieta formulada seca, inerte o de destete que se administra a las larvas como primer alimento, cuyo tamaño de partículas varía entre 25 y 800 μm , aunque debe adaptarse al tamaño de la boca de la especie. Dependiendo la técnica utilizada para su elaboración encontramos dietas microparticuladas, microagregadas, microvestidas o microextruídas (Fernández-Díaz *et al.*, 1994; Cahu & Zambonino-Infante, 2001; Langdon & Barrows, 2011; Kolkovski, 2013).

A pesar del éxito que representa el uso del alimento vivo también presenta algunas limitantes como calidad nutricional incierta y mayor inversión de espacio, tiempo y dinero al conformar los llamados “cultivos auxiliares” que incrementan los costos de producción durante esta fase del cultivo (Cahu & Zambonino-Infante, 2001; Takeuchi *et al.*, 2003; Martínez-Palacios *et al.*, 2006).

La sustitución de presas vivas por microdietas tiene muchas ventajas como; composición nutricional uniforme y adaptable a las necesidades de cada especie, disponibilidad constante y reducción de costos de alimentación. Pese a ello, las dietas desarrolladas no han igualado la eficiencia del alimento vivo y se carece de microdietas que puedan reemplazar por completo al alimento vivo en el cultivo larvario de muchas especies de peces (Lazo, 2000; Holt *et al.*, 2011; Kolkovski, 2013).

En el caso particular del Pez blanco, Martínez-Ángeles (2022) probó una serie de microdietas formuladas (52% de proteína y 22% de lípidos), combinando proteínas solubles y fibrosas en diferentes proporciones. En este estudio se concluyó que la especie puede consumir microdietas desde el momento de la eclosión, sin embargo cuando las larvas son destetadas a los 10 dpe el crecimiento y la supervivencia son mejores. Se encontró que la dieta más adecuada para las larvas de *C. estor* bajo las condiciones experimentales es la que contiene 278 g de proteína soluble Kg⁻¹. Aunque la microdieta fue aceptada por los organismos y se obtuvieron resultados prometedores, no se consiguió superar al desempeño logrado con el rotífero.

Con la finalidad de mejorar dicha microdieta se han agregado algunos ingredientes como el ácido alfa lipoico, pero el alimento vivo sigue presentando mejores resultados (Monroy De la Peña, 2018). Recientemente, nuestro grupo de investigación logró dar una respuesta más concreta del por qué el rotífero sigue siendo la mejor opción para la larvicultura. En dicho estudio se vio que el rotífero ejerce un efecto positivo en la expresión de genes involucrados en el crecimiento de cartílago, hueso y músculo, además de genes relacionados con enzimas digestivas y desarrollo del sistema digestivo (Juárez-Gutiérrez *et al.*, 2021). La autora recomienda la suplementación con probióticos, prebióticos o enzimas

digestivas como vía potencial de progreso en este campo de estudio (Juárez-Gutiérrez, 2020).

2.3 Suplementos dietéticos

Los ingredientes funcionales son componentes alimenticios que tienen un efecto fisiológico más allá de su aporte nutricional y afecta una o más funciones en el organismo, mejorando la salud o la resistencia a las enfermedades (Roberfroid, 2000). En los últimos años estos suplementos han cobrado relevancia, debido a la necesidad de nuevas medidas profilácticas que puedan reemplazar o reducir el uso de antibióticos en alimentos para animales como promotores de crecimiento y estimulantes del sistema inmune (Amenyogbe *et al.*, 2020), además de ser notables al mejorar la eficiencia productiva y la calidad de los peces en cultivo (Yukgehnaish *et al.*, 2020a).

Dentro de este variado grupo encontramos a los probióticos y prebióticos, aditivos ampliamente utilizados en la nutrición humana y animal (Amenyogbe *et al.*, 2020; Guerreiro *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020).

2.3.1 Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en concentraciones adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped (FAO/OMS, 2001; Hill *et al.*, 2014). Existen diversas revisiones donde describen a profundidad los usos, mecanismos de acción y criterios de selección de los probióticos en acuicultura (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Merrifield *et al.*, 2010; Hai, 2015; Ringø *et al.*, 2018; Hasan & Banerjee, 2020; Ringø *et al.*, 2020).

Tomando como base la revisión de Merrifield *et al.* (2010), las características esenciales que debe tener un microorganismo para ser considerado como probiótico dirigido a organismos acuáticos son:

- 1) No deben ser patógenos, no solo con la especie huésped sino también con los animales acuáticos en general y los consumidores humanos.
- 2) Libres de genes de resistencia a antibióticos codificados por plásmidos.

3) Resistentes a las sales biliares y a un pH bajo.

Y preferentemente deben ser capaces de adherirse y/o crecer bien dentro de la mucosa intestinal, colonizar la superficie epitelial intestinal, poder registrarse para su uso como aditivo alimentario, mostrar características de crecimiento ventajosas y/o crecimiento a temperaturas de crianza del huésped, exhibir propiedades antagónicas hacia uno o más patógenos clave, producir enzimas digestivas extracelulares relevantes, ser autóctono del huésped o del entorno de crianza, ser viable en condiciones normales de almacenamiento y suficientemente robusto para sobrevivir los procesos de manejo y producción de los alimentos a nivel industrial.

Hasta la fecha, una gama de probióticos potenciales han sido investigados para su aplicación en el sector acuícola, incluyendo bacterias como *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Paenibacillus*, *Phaeobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Rhodospiridium*, *Roseobacter*, *Shewanella*, *Streptomyces* y *Vibrio*; microalgas como *Tetraselmis* y levaduras como *Saccharomyces*, *Debaryomyces* y *Phaffia* (Kesarodi-Watson *et al.*, 2008; Nayak, 2010; Hai, 2015; Amenyogbe *et al.*, 2020; Ringø *et al.*, 2020). Dentro del género *Lactobacillus* existen varias especies de interés probiótico en animales acuáticos, entre las que destacan *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, y *L. rhamnosus* (Ringø *et al.*, 2018).

La actividad y uso de los probióticos depende de varios factores, principalmente de la especie huésped, origen, forma de administración, dosis y duración de la suplementación. Se pueden administrar de manera prolongada o en intervalos regulares, por vía oral junto con el alimento para mejorar la microbiota benéfica asociada al intestino o en el agua de cultivo, donde proliferan y eliminan a las bacterias patógenas del medio por inanición, al consumir todos los nutrientes disponibles. También es común administrar varias cepas probióticas o de manera conjunta con prebióticos u otros productos vegetales (Hai, 2015; Hasan & Banerjee, 2020; Ringø *et al.*, 2020).

Los probióticos presentan varios mecanismos de acción como: síntesis de compuestos que ayudan en la digestibilidad o aportan nutrientes al huésped (p.e enzimas digestivas, vitaminas, antioxidantes, ácidos grasos y minerales), secreción de sustancias importantes en la inhibición y proliferación de patógenos (p. e lisozima) lo que regula la microbiota intestinal, competencia física con los patógenos por los sitios de unión en la mucosa intestinal, cambios en la histomorfometría intestinal (p.e mayor número o tamaño de microvellosidades) aumentando el área de absorción de nutrientes, reducción de hormonas relacionadas con el estrés, promoción de la respuesta inmune (p.e mayor actividad fagocítica de los leucocitos) y mejora de la calidad del agua al participar en la renovación de nutrientes orgánicos (Ringø *et al.*, 2018, 2020; Hasan & Banerjee, 2020).

2.3.2 Prebióticos

El concepto prebiótico se introdujo por primera vez hace más de 25 años (Gibson & Roberfroid, 1995) y desde entonces ha sufrido diversas modificaciones. Actualmente, se definen como “sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos hospedadores que confieren un beneficio para la salud”, es decir, estos ingredientes se dirigen a la microbiota asociada a humanos y animales con el objetivo de mejorar la salud. Se trata de sustratos no viables y no digeribles por el huésped, que sirven como nutrientes para los microorganismos benéficos que habitan en el tracto gastrointestinal del hospedador (Gibson *et al.*, 2017).

En el sector acuícola han recibido menos atención con respecto a los probióticos (Butt & Volkoff, 2019), pese a que se consideran suplementos respetuosos con el medio ambiente y son útiles para mejorar el crecimiento y las actividades microbianas del tracto digestivo, lo que a menudo fortalecen el sistema inmune y la tolerancia al estrés (Yukgehnaish *et al.*, 2020a).

Los prebióticos son carbohidratos, que se clasifican en monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos por su tamaño molecular o polimerización. En cultivo de peces, los más empleados son: inulina, los fructooligosacáridos (FOS), fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS), oligofruktosa, mananoligosacáridos

(MOS), galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS) y los arabinoxilooligosacáridos (IMOXoligosacáridos) (Ringø *et al.*, 2010, 2014; Yukgehnaish *et al.*, 2020a).

La inulina es un oligosacárido natural con actividad prebiótica que se encuentra presente en gran cantidad de plantas como carbohidratos de almacenamiento (Niness, 1999), compuesta de β -D-Fructofuranosa unidas con enlaces β -2-1 (Yukgehnaish *et al.*, 2020a).

Por su parte, la pared celular es una estructura compleja que brinda protección física y soporte osmótico. Está compuesta principalmente de polisacáridos (~80 %) y proteínas (~15%). En *S. cerevisiae* se compone de tres grupos principales de polisacáridos: polímeros de *N*-acetilglucosamina (quitina, del 1-2%), polímeros de manosa (manoproteínas, del 35-40%) y polímeros de glucosa (β -glucano, alrededor del 60%). El β -glucano se puede dividir en dos subtipos dependiendo del tipo de enlaces de glucosa: cadenas largas de ~1500 unidades de β -1,3-glucosa (50-55%) y cadenas cortas de ~150 unidades de β -1,6-glucosa (5-10%) (Aguilar-Uscanga & François, 2003; Klis *et al.*, 2002). Los últimos dos polisacáridos (β -glucanos y mananoligosacáridos), son prebióticos de amplio uso en organismos acuáticos (Meena *et al.*, 2013; Selim & Reda, 2015; Carballo *et al.*, 2019; Servin-Arce *et al.*, 2021). Existe relativamente poca información de su uso como prebiótico en acuicultura, pero se ha encontrado que tiene influencia positiva en el crecimiento, morfología intestinal y composición corporal de las especies, además de considerarse como un estimulador inespecífico del sistema inmune (Selim & Reda, 2015; Servin-Arce *et al.*, 2021).

2.4 Efectos de los probióticos y prebióticos en organismos acuáticos

Hay mucha información en torno a los usos y potenciales efectos de los probióticos y prebióticos por separado o en conjunción, en acuicultura. Diversos autores les han atribuido diferentes efectos en su mayoría favorecedores como; mayor crecimiento, aumento en la supervivencia, estimulación del sistema inmune, resistencia a patógenos, cambios benéficos en la morfología del intestino y modulación de la microbiota intestinal, siendo este último punto uno de los

principales intereses del uso de aditivos funcionales (Ringø *et al.*, 2010; Ringø *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014; Torrecillas *et al.*, 2014; Amenyogbe *et al.*, 2020).

En cuanto a la modulación de la microbiota intestinal, favorecen el desarrollo de ciertas especies bacterianas (p.e. el género *Bacillus*) capaces de mejorar la eficiencia del crecimiento de los peces y reduciendo la susceptibilidad a enfermedades del huésped, respaldado por investigaciones que indican que el tracto gastrointestinal constituye la primera línea de defensa contra patógenos, además de considerarse uno de los principales puertos de entrada de infecciones (Ringø *et al.*, 2010, 2014; Oliveira *et al.*, 2020; Servin-Arce *et al.*, 2021).

Por el contrario, existen pocos reportes donde los efectos no fueron favorables. En el caso de la inulina, a altas concentraciones (>7%) se reportaron efectos negativos sobre el intestino y la diversidad microbiana de algunas especies como la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) (Olsen *et al.*, 2001; Ringø *et al.*, 2006), el Salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.) (Bakke-McKellep *et al.*, 2007) y la Dorada (*Sparus aurata*). En esta última especie, la combinación de *Bacillus subtilis* e inulina redujo la riqueza bacteriana del intestino (Cerezuela *et al.*, 2013). En el anexo 13.1 se presenta una tabla donde se resumen los hallazgos más relevantes de algunos probióticos y prebióticos en otras especies de interés acuícola.

2.5 Microbiota intestinal

Se define a la microbiota como la colección de microorganismos presentes en un ecosistema (Gibson *et al.*, 2017), que desempeña un papel fundamental en el para los organismos, llegando a reconocerse como un “órgano extra” que ayuda a mantener la salud y el bienestar de los individuos. Hoy en día existen revisiones dedicadas a la importancia de la microbiota intestinal en animales acuáticos, así como a los factores que influyen en esta, los enfoques de estudio y los avances en este campo de investigación (Nayak, 2010; Ghanbari *et al.*, 2015; Tarnecki *et al.*, 2017; de Bruijn *et al.*, 2018; Egerton *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Butt & Volkoff, 2019; López Nadal *et al.*, 2020; Yukgehnash *et al.*, 2020b; Johny *et al.*, 2021).

En estas revisiones podemos ver que la microbiota intestinal de los peces se ve influenciada por un sinnúmero de factores que podemos clasificar en internos, como la

edad, sexo, genética, estrés, etc., y externos; como la dieta, entorno, ubicación geográfica, estación del año, etc. La microbiota intestinal está involucrada en procesos fundamentales como la adquisición, digestión y absorción de nutrientes, metabolismo, homeostasis energética, sistema inmune y protección contra patógenos y en la diferenciación y maduración del epitelio intestinal.

En peces la microbiota intestinal es muy diversa, incluye protozoarios, hongos, levaduras, arqueas y principalmente bacterias (Egerton *et al.*, 2018), siendo más abundantes los *phyla* Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Fusobacteria, constituyendo más del 80% (Nayak, 2010; Bledsoe *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Yukgehnaish *et al.*, 2020a).

2.5.1 Evaluación metagenómica de las comunidades bacterianas en peces

Los estudios sobre microbiota gastrointestinal basados en cultivo, con frecuencia conducen a resultados poco representativos de la comunidad microbiana total, esto debido a que las bacterias cultivables comprenden un porcentaje extremadamente bajo (Yukgehnaish *et al.*, 2020a). Actualmente, se utilizan técnicas moleculares novedosas independientes de cultivo que proporcionan una perspectiva poderosa y relativamente libre de sesgos (Nayak, 2010). Los enfoques utilizados dependen de los objetivos de estudio (Zhou *et al.*, 2014) y en general se emplean tres estrategias principales (Tarnecki *et al.*, 2017):

- 1) Hibridación fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés) que utiliza sondas fluorescentes para observar directamente a los microorganismos utilizando microscopía y proporcionando una vista tridimensional de la comunidad, además de permitir la observación de las relaciones espaciales entre microorganismos.
- 2) Análisis de huellas genéticas (DNA fingerprinting), que se basan en la amplificación por PCR de regiones variables dentro de los operones ribosomales exclusivos de las especies bacterianas. Sin embargo, los resultados son más cualitativos y en gran medida informan sobre cuán complejas son las comunidades pero no sobre las unidades taxonómicas operativas (OTU) específicas que componen cada comunidad.

- 3) Secuenciación de genes bacterianos, basadas principalmente en la secuenciación del gen ARNr 16S, constituyendo el enfoque más completo y preciso para la identificación bacteriana.

Los análisis de las comunidades bacterianas en peces han utilizado casi exclusivamente la secuenciación del gen ARNr 16S utilizando plataformas de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés), como la secuenciación Illumina (Ghanbari *et al.*, 2015). Este gen se usa ampliamente por el alto grado de conservación de su secuencia y su ubicuidad en arqueas y bacterias, además de tener nueve regiones con tasas evolutivas variables que permiten descifrar relaciones filogenéticas (Ortiz-Estrada *et al.*, 2019).

En general, los objetivos de la investigación metagenómica de los microbiomas intestinales de los peces son varios, incluyendo el estudio de los factores que influyen en la composición del microbioma intestinal de los organismos y el efecto fisiológico de éste en el huésped, identificación de la microbiota núcleo de las especies, detección de patógenos, reconocimiento y desarrollo de nuevos probióticos para especies de importancia económica y nutricional, desarrollo de estrategias de manipulación microbiana, entre otros (Ghanbari *et al.*, 2015; Martínez-Porchas & Vargas-Albores, 2017; Yukgehnaish *et al.*, 2020a). Este último punto es uno de los más importantes para el sector acuícola, debido a la necesidad creciente de técnicas efectivas para modificar las comunidades microbianas del intestino en pro del desarrollo y salud de las especies en cultivo. Los enfoques de manipulación del microbioma incluyen probióticos, prebióticos, inmunoestimulantes, vitaminas y nucleótidos (Merrifield *et al.*, 2010; Ringø *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de microdietas balanceadas eficaces representa un avance crucial para la larvicultura comercial de muchas especies de peces que no se ha conseguido. Las microdietas formuladas hasta el momento son deficientes y no superan el éxito del alimento vivo, por lo que se sigue dependiendo de éste. Una alternativa que ha ganado interés en el sector productivo es el uso de suplementos dietéticos del tipo probiótico y prebiótico, capaces de promover el crecimiento, la supervivencia y la salud de los organismos, además de manipular positivamente a la microbiota intestinal, que como es bien sabido, desempeña un papel fundamental para los individuos. Sin embargo, gran parte de los estudios realizados sobre suplementación probiótica y prebiótica en peces se centran en los efectos sobre el crecimiento e inmunidad y las investigaciones que incluyen a la microbiota del intestino se basan en técnicas de cultivo.

Por lo anterior y aunado a que *Chirostoma estor* carece de estómago y su intestino es relativamente corto, se considera que suplementar microdietas para larvas de Pez blanco puede abonar al desarrollo de dietas más eficientes con capacidad de sustituir total o parcialmente el uso de presas vivas en la larvicultura y al establecimiento de un cultivo más rentable de la especie, además de aportar al conocimiento de la manipulación microbiana en tractos digestivos agástricos.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿La adición de prebióticos y probióticos en microdietas para larvas de Pez blanco mejorará el crecimiento y supervivencia de los peces?
- ¿Las comunidades microbianas de las larvas alimentadas exclusivamente con rotíferos serán distintas a la microbiota presente en los organismos alimentados con microdietas?
- ¿Los suplementos utilizados tendrán efectos positivos significativos en la microbiota intestinal de las larvas de *C. estor*?

5. HIPÓTESIS

Hipótesis 1:

El crecimiento y supervivencia de las larvas de Pescado blanco (*Chirostoma estor*) alimentadas con microdietas suplementadas con probióticos y prebióticos serán superiores a los obtenidos al alimentarlas con alimento vivo (*Brachionus plicatilis*).

Hipótesis 2:

La microbiota intestinal de las larvas alimentadas con rotíferos será significativamente distinta a la microbiota presente en los organismos alimentados con microdietas.

Hipótesis 3:

Las microdietas suplementadas con probióticos y prebióticos tendrán un efecto significativo en la microbiota intestinal de las larvas de Pescado blanco (*Chirostoma estor*), aumentando la abundancia de bacterias benéficas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de microdietas suplementadas con prebióticos (inulina de agave y pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*), probióticos (*Lactobacillus acidophilus*) y una combinación de ambos, en el crecimiento, supervivencia y microbiota intestinal del modelo biológico agástrico *Chirostoma estor*, comparadas con alimento vivo, rotíferos (*Brachionus plicatilis*).

6.2 Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento y supervivencia de larvas de *C. estor* alimentadas con microdietas enriquecidas con prebióticos y/o probióticos y con alimento vivo.
- Analizar la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas con microdietas enriquecidas con prebióticos y/o probióticos y con alimento vivo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Evaluación de prebióticos y probióticos en el crecimiento y supervivencia de larvas de Pez blanco

Se realizó un experimento de alimentación durante 32 días donde se probaron diferentes microdietas suplementadas con probióticos, prebióticos o una combinación de ambos y dos tratamientos control; microdieta sin suplementos y alimento vivo rotífero (los tratamientos se describen en la sección 7.1.3).

7.1.1 Descripción de la unidad experimental

El experimento se realizó en la planta de Pez Blanco del Laboratorio de Biotecnología Acuícola (LANMDA-UMSNH). Se utilizó un sistema de recirculación de agua (RAS) bajo invernadero, con seis tinas de 50 L de capacidad, dentro de las cuales se instalaron seis contenedores (unidades experimentales) de 2 L elaborados con tubos de PVC y malla de 40 micras. En total se manejaron 36 unidades experimentales (UE), cada una representando a una réplica de un tratamiento, distribuidos al azar (figura 1).

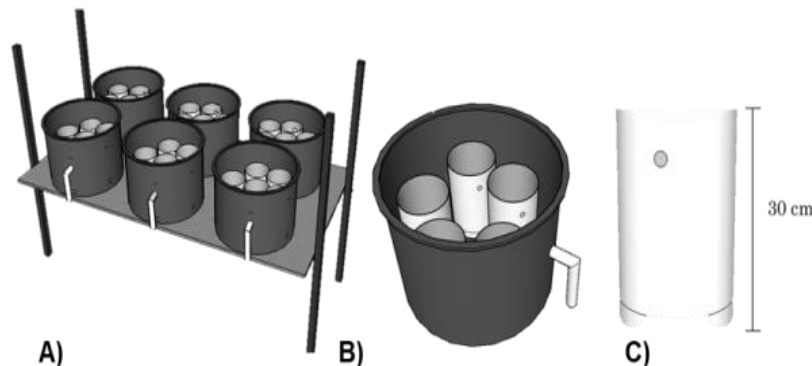


Figura 1. Sistema de recirculación de agua (A), distribución de las unidades experimentales (B) y unidad experimental (C).

7.1.2 Larvas experimentales

De un lote de peces nacidos en la planta de Pez Blanco del Laboratorio de Biotecnología Acuícola se tomaron 5400 larvas de 7 a 11 días post eclosión (dpe)

con un peso seco inicial promedio de 0.155 mg y una longitud total inicial de 5.75 ± 0.547 mm, que fueron distribuidas aleatoriamente en grupos de 150 larvas por réplica, es decir 600 peces por tratamiento.

7.1.3 Diseño experimental y plan de alimentación

Se establecieron nueve tratamientos de alimentación (tabla 1) por cuadruplicado, dos de ellos fungieron como testigos: alimento vivo (rotíferos) y microdieta control. Los siete tratamientos restantes consistieron en microdietas suplementadas con la cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* [0.5%]; con prebióticos, inulina de agave (YŪXI ®) [2%] y pared celular de levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) (Safmannan ®) [0.025%] o una combinación de ambos (tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos de alimentación evaluados en larvas de *C. estor* durante 32 días.

| No. | Clave | Tratamiento | Tipo |
|-----|------------|--|-------------------|
| 1 | R | Rotíferos (<i>Brachionus plicatilis</i>) | Control |
| 2 | C | Microdieta control | |
| 3 | I | Microdieta + inulina de agave | Prebiótico |
| 4 | W | Microdieta + pared celular de levadura | |
| 5 | WI | Microdieta + inulina + pared celular | |
| 6 | L | Microdieta + <i>L. acidophilus</i> | Probiótico |
| 7 | LI | Microdieta + <i>L. acidophilus</i> + inulina | |
| 8 | LW | Microdieta + <i>L. acidophilus</i> + pared celular | Simbiótico |
| 9 | LWI | Microdieta + <i>L. acidophilus</i> + pared celular + inulina | |

Los rotíferos fueron producidos en la planta de alimento vivo del LANMDA bajo las condiciones establecidas por el laboratorio. Por su parte, las microdietas utilizadas se formularon al 52% de proteína y 22% de lípidos, con 278 g de proteína soluble Kg^{-1} , conforme a Martínez-Ángeles, 2022 y fueron elaboradas en un secador por aspersion Niro Atomizer, Soeborg, Denmark Type MM-100, con los siguientes parámetros promedio: temperatura de entrada 156.25 °C, temperatura

de salida 96.58 °C, velocidad del atomizador 39227 rpm, volumen de entrada 1.7 L y cantidad obtenida 348.33 g.

Se trazó un plan de alimentación que básicamente consiste en tres partes: alimentación con presas vivas, co-alimentación; administración de rotíferos y microdietas, y alimentación exclusiva con microdietas (tabla 2). Las microdietas se suministraron a saciedad aparente, de forma manual.

Tabla 2. Plan de alimentación seguido durante los 32 días de experimentación.

| Día experimental | Descripción |
|-------------------------|--|
| 1 - 4 | Rotífero: dos veces al día (10:00 y 15:00 h). Rotífero: dos veces al día (10:00 y 15:00 h). |
| 5 - 20 | Microdieta: cuatro veces al día en intervalos de dos horas (09:00, 11:00, 13:00 y 15:00 h). |
| 21 - 32 | Microdieta: 24 veces al día en intervalos de una hora. |

*En el tratamiento control rotífero (R) únicamente se usó este alimento, por lo que se aplicó lo descrito para los días 1-4 durante todo el experimento.

7.1.5 Condiciones experimentales y manejo larvario

Durante el periodo experimental se manejó un fotoperiodo de luz continua (24L:00D). Dos veces al día (9:00 y 17:00 h) se determinó la temperatura (°C) y salinidad del agua (g L⁻¹), con ayuda de un termómetro de inmersión parcial (Brannan) y un refractómetro (ATAGO ®), respectivamente. Cada semana se monitoreo el pH con un potenciómetro (Fisher Scientific accumet AB15 Basic ®) y la concentración de amoníaco (NH₃), amonio (NH₄), nitrito (NO₂) y nitrato (NO₃) mediante espectrofotometría (Fotómetro YSI 9500 ®). En la tabla 3 se resumen los parámetros fisicoquímicos registrados y en la figura 2 se muestra el comportamiento de la temperatura diaria.

Con la finalidad de mantener una buena calidad de agua, cada día previo a la primera alimentación se realizó la limpieza de las unidades experimentales mediante sifoneo.

Tabla 3. Valores (promedio \pm desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos registrados durante el periodo experimental.

| Parámetro | Valor |
|--|------------------|
| Temperatura (°C) | 17.61 \pm 1.37 |
| Salinidad (g L ⁻¹) | 6.70 \pm 1.39 |
| pH | 8.10 \pm 1.60 |
| Amoníaco (mg L ⁻¹ NH ₃) | 0.35 \pm 0.36 |
| Amonio (mg L ⁻¹ NH ₄) | 0.37 \pm 0.37 |
| Nitritos (mg L ⁻¹ NO ₂) | 0.17 \pm 0.14 |
| Nitratos (mg L ⁻¹ NO ₃) | 3.16 \pm 0.007 |

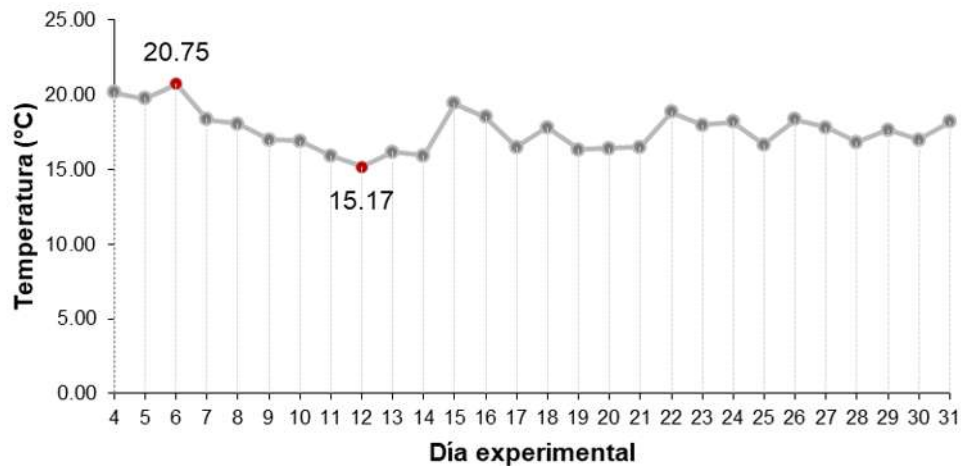


Figura 2. Temperatura del agua (°C) registrada diariamente (promedio \pm desviación estándar) durante el experimento de alimentación.

7.1.6 Muestreos

Se realizaron dos muestreos, uno al principio de experimento, donde se tomaron 40 organismos del lote inicial, y otro al concluir el ensayo, donde se colectó el número final de larvas, de acuerdo a la supervivencia de cada réplica. En ambos casos se determinó la longitud total (mm) con un vernier digital (ATAGO ®) y el peso seco (mg) con una balanza analítica (Denver instrument APX-200 ®) de acuerdo a (Martínez-Palacios *et al.*, 2002a). Durante este último muestreo se colectaron muestras para el análisis de la microbiota intestinal (ver sección 7.2.1).

7.1.7 Estimación de parámetros productivos y supervivencia

Tras concluir el experimento de alimentación, se calculó la supervivencia y los siguientes parámetros de producción: peso ganado (%), tasa de crecimiento específico (TCE) (% día⁻¹) y ganancia de peso individual (GPI) (mg/día), con las siguientes fórmulas:

$$\text{Supervivencia (\%)} = (\text{número final de larvas} / \text{número inicial de larvas}) \times 100$$

$$\text{Peso ganado (\%)} = [(\text{Peso final (mg)} - \text{Peso inicial (mg)}) / \text{Peso inicial (mg)}] \times 100$$

$$\text{TCE (\% día}^{-1}\text{)} = ((\text{Ln peso final (mg)} - \text{Ln peso inicial (mg)}) / \text{tiempo (días)}) \times 100$$

$$\text{GPI (mg/día)} = [\text{Peso final (mg)} - \text{Peso inicial (mg)}] / \text{Tiempo (días)}$$

7.1.8 Análisis bromatológicos

Se realizaron análisis bromatológicos por triplicado a las diferentes microdietas utilizadas, conforme a los procedimientos de la AOAC (2000). El análisis incluyó: determinación de humedad; donde las muestras fueron secadas a 105 °C por 24 h, en estufa Thermo Scientific Heratherm ®; determinación de extracto etéreo, mediante el método de Soxhlet; proteína cruda (N x 6.25) mediante el método Dumas usando un analizador de Nitrógeno (Leco FP 528 ®) y determinación del porcentaje de ceniza por incineración en mufla Fisher Scientific ® a 550 °C durante 12 h. Finalmente se calculó el extracto libre de nitrógeno (ELN) de la siguiente manera: ELN= 100 - (% proteína + % lípidos + % cenizas).

7.1.9 Análisis estadístico

Los resultados de crecimiento en peso seco y longitud total, los parámetros productivos calculados y los análisis bromatológicos de las microdietas se sometieron a pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk o D' Agostino & Pearson) y homocedasticidad (Prueba de Levene), si los datos cumplían con los supuestos se utilizó un análisis de varianza a una vía (ANOVA) con una prueba *post hoc* de Tukey, de lo contrario se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una prueba de Dunn's como *post hoc*, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

También se calculó la prueba de poder estadístico para cada análisis de varianza realizado, obteniéndose un valor de $p=1$.

Todas las pruebas mencionadas se realizaron en el software R v4.0.2 (R Core Team, 2020).

7.2 Evaluación de la microbiota intestinal utilizando prebióticos y probióticos en la dieta

7.2.1 Muestreo y extracción de material genético microbiano del intestino de peces

Para el análisis de la microbiota intestinal se sacrificaron por shock térmico tres peces por réplica. Como las larvas eran muy pequeñas para extraer el tracto intestinal, después del sacrificio se realizó un procedimiento de eliminación de la microbiota externa que consistió en sumergir a los organismos por tres segundos en solución de hipoclorito de sodio al 0.05%, seguido de un enjuague con buffer fosfato salino (PBS) todo ello con el fin de obtener una muestra representativa de la microbiota interna utilizando larvas completas. Finalmente, se cortaron las cabezas de las larvas con navajas desechables para cada una y se descartaron. El resto de los cuerpos se colocaron en un “pool” de tres peces por réplica, en tubos eppendorf de 1.5 mL con etanol al 96% y se preservaron a una temperatura de -80°C hasta su posterior procesamiento.

La extracción del ADN metagenómico se realizó por el método de buffer bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (anexo 13.2). La pureza y la cantidad del ADN extraído se midió usando NanoDrop 2000 (ThermoFischer Scientific®), basándose en la relación de absorbancia a 260/280 nm.

Como las muestras W1, L1 y W12 fueron excluidas del análisis de desempeño larvario por presentar valores extremos, también fueron descartadas para la extracción de ADN y demás análisis posteriores.

7.2.2 Secuenciación

El material genético obtenido fue enviado para su secuenciación al Laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

(CIAD) unidad Mazatlán, perteneciente al LANMDA. Para la preparación de la biblioteca de amplicones se amplificó por PCR la región V3 del gen 16S ARNr con los cebadores V3-338f y V3-533r (Huse *et al.*, 2008). La secuenciación se realizó en un equipo Illumina Miniseq en condiciones estándar (300 ciclos, 2x150 pair-end), conforme a los protocolos del laboratorio.

7.2.3 Análisis bioinformático

Inicialmente, se revisó la calidad de las secuencias con FastQC v0.11.7 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), enseguida se combinaron las lecturas pair-end utilizando FLASH v1.2.11 (Magoč & Salzberg, 2011). La dereplicación, eliminación de quimeras y la agrupación de las secuencias en Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) al 97% de identidad se realizó con la herramienta VSEARCH v2.10.4 (Rognes *et al.*, 2016), los singletons (secuencias únicas) fueron eliminados del análisis. La anotación taxonómica se llevó a cabo con la base de datos SILVA v138.1 (Quast *et al.*, 2013; Yilmaz *et al.*, 2014).

Debido a la baja cantidad de secuencias obtenidas en la réplica 1 del tratamiento *L. acidophilus* - inulina (LI1) se excluyó del análisis, por lo que en el análisis final sólo se incluyeron 32 muestras.

7.2.4 Análisis estadístico y graficación

El esfuerzo de muestreo de especies se determinó a partir de curvas de rarefacción, también se calcularon los índices de diversidad alfa Chao1 y Shannon que fueron sometidos a un análisis de varianza a una vía (ANOVA) y la prueba *post hoc* de Tukey con un p-valor=0.05.

La diversidad beta se visualizó mediante un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) con distancias de Bray-Curtis y 999 permutaciones a nivel de OTUs, utilizando el paquete Vegan versión 2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2019). Las variaciones de las comunidades se compararon con un análisis de similitudes (ANOSIM) y un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA

Adonis). Se construyeron gráficos de abundancia relativa (%) a nivel phylum y a nivel género y se identificaron los géneros y OTUs únicos y compartidos con gráficos de intersecciones (UpSet). Todos los análisis antes mencionados se realizaron en R v4.0.2 (R Core Team, 2020).

Finalmente, se revisó la abundancia diferencial de *phyla* y géneros mediante un análisis discriminante lineal (LDA) del tamaño del efecto (LEfSe) (Segata *et al.*, 2011), realizado en Galaxy (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>).

8. RESULTADOS

8.1 Análisis bromatológicos de las microdietas

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de los análisis bromatológicos de las microdietas usadas. Aunque su formulación fue igual, al analizar la composición final se encontraron diferencias significativas en su composición ($p < 0.05$), lo que pudo haber interferido en los resultados finales del experimento.

Tabla 4. Composición proximal (promedio \pm desviación estándar) o de las microdietas utilizadas durante el experimento de alimentación. Índices diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

| T | Proteína (%) | Lípidos (%) | ELN (%) | Humedad (%) | Cenizas (%) |
|-----|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| C | 54.30 \pm 0.21 ^c | 16.41 \pm 0.62 ^a | 23.28 \pm 0.39 ^b | 2.00 \pm 0.06 ^c | 6.01 \pm 0.05 ^d |
| I | 49.00 \pm 0.08 ^e | 16.73 \pm 0.42 ^a | 26.22 \pm 0.55 ^a | 1.57 \pm 0.09 ^d | 8.06 \pm 0.05 ^a |
| W | 56.96 \pm 0.18 ^a | 11.01 \pm 0.65 ^c | 28.72 \pm 0.46 ^a | 5.81 \pm 0.23 ^a | 6.70 \pm 0.17 ^c |
| WI | 55.76 \pm 0.21 ^b | 10.33 \pm 0.36 ^b | 27.45 \pm 0.54 ^a | 2.16 \pm 0.16 ^c | 6.46 \pm 0.95 ^c |
| L | 55.27 \pm 0.20 ^b | 12.83 \pm 0.44 ^c | 24.95 \pm 0.50 ^b | 2.98 \pm 0.13 ^b | 6.95 \pm 0.07 ^b |
| LI | 56.06 \pm 0.12 ^b | 11.81 \pm 0.34 ^c | 26.44 \pm 0.45 ^a | 2.21 \pm 0.03 ^{bc} | 5.68 \pm 0.04 ^e |
| LW | 54.33 \pm 0.26 ^c | 16.60 \pm 0.82 ^a | 23.33 \pm 1.05 ^b | 2.61 \pm 0.22 ^b | 5.73 \pm 0.01 ^e |
| LWI | 53.52 \pm 0.05 ^d | 15.90 \pm 0.62 ^a | 24.72 \pm 0.71 ^{ab} | 2.15 \pm 0.14 ^c | 5.78 \pm 0.10 ^{de} |

Donde T= tratamiento, ELN= extracto libre de nitrógeno, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* + pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina.

8.3 Desempeño larvario

A los 32 días de alimentación, se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) en peso seco, donde las larvas de los tratamientos controles (R y C) y las suplementadas con pared celular (W) y pared celular-inulina (WI) alcanzaron pesos más altos. Por su parte, en los organismos que consumieron microdieta con inulina (I) y *L. acidophilus* (L, LI, LW y LWI) el crecimiento fue menor (figura 3).

En el crecimiento en longitud se encontró que los organismos que consumieron solo rotífero (R) y pared celular-inulina crecieron más, alcanzando los 12.37 \pm 1.88 mm y 11.40 \pm 1.25 mm, respectivamente. En este caso, microdieta control (C)

y microdieta + pared celular (WI) obtuvieron un crecimiento similar, aunque estadísticamente menor, al igual que los tratamientos LW y LWI. Los peces que consumieron inulina (I), *L. acidophilus* (L) y *L. acidophilus*-inulina (LI) crecieron menos (Figura 4).

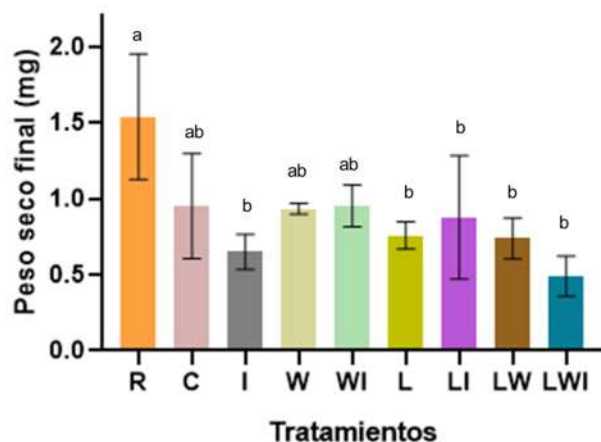


Figura 3. Peso seco final de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Índices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* + pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina.

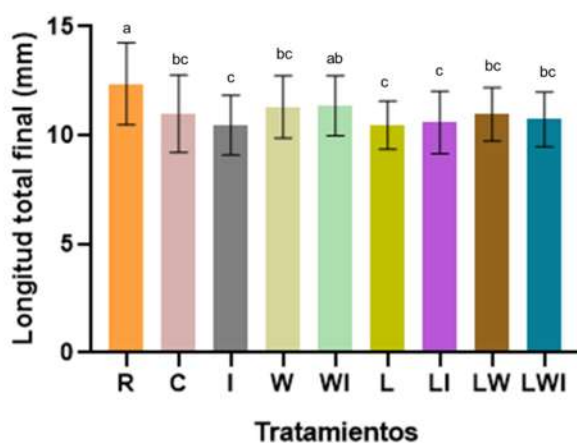


Figura 4. Longitud total final de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Índices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* + pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina.

Los parámetros productivos calculados; peso ganado (PG), tasa de crecimiento específico (TCE) y ganancia de peso individual (GPI), mostraron un comportamiento similar al crecimiento en peso, donde los tratamientos rotífero (R), microdieta control (C), microdieta + pared celular (W) y microdieta + pared celular-inulina (WI) mostraron mejores resultados (Tabla 5).

Tabla 5. Peso ganado (%), tasa de crecimiento específico (% día⁻¹) y ganancia de peso individual (mg día⁻¹) (promedio ± desviación estándar) de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Índices diferentes en las columnas indican diferencias significativas (p<0.05).

| T | PG (%) | TCE (% día ⁻¹) | GPI (mg día ⁻¹) |
|----------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| R | 966.9 ± 282.5 ^a | 7.095 ± 0.768 ^a | 0.043 ± 0.013 ^a |
| C | 613.3 ± 221.9 ^{ab} | 5.520 ± 1.097 ^{ab} | 0.025 ± 0.011 ^{ab} |
| I | 419.1 ± 74.71 ^b | 4.436 ± 0.601 ^{bc} | 0.015 ± 0.004 ^b |
| W | 602.1 ± 22.53 ^{ab} | 5.609 ± 0.116 ^{abc} | 0.024 ± 0.001 ^{ab} |
| WI | 614.4 ± 88.82 ^{ab} | 5.651 ± 0.464 ^{ab} | 0.025 ± 0.004 ^{ab} |
| L | 489.0 ± 58.43 ^b | 4.946 ± 0.363 ^{bc} | 0.019 ± 0.003 ^b |
| LI | 565.7 ± 261.5 ^{ab} | 5.197 ± 1.301 ^{abc} | 0.022 ± 0.013 ^b |
| LW | 476.0 ± 87.98 ^b | 4.834 ± 0.592 ^{bc} | 0.018 ± 0.004 ^b |
| LWI | 316.4 ± 85.34 ^b | 3.507 ± 0.901 ^c | 0.010 ± 0.004 ^b |
| p-valor | 0.0016 | 0.0004 | 0.0007 |

Donde T= tratamiento. PG= peso ganado. TCE= Tasa de crecimiento específico. GPI= Ganancia de Peso Individual. R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* + pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina.

8.4 Supervivencia

La supervivencia no se vio afectada por los tratamientos de alimentación (p=0.0586), aunque de manera general se obtuvo una baja tasa (Figura 5). Si bien estadísticamente los resultados no son significativos, se observa que en los tratamientos que incluían *L. acidophilus* hubo un mayor número de larvas al término del experimento (LWI, L LI y LW, en ese orden), lo que pudo haber tenido alguna influencia en los resultados de desempeño.

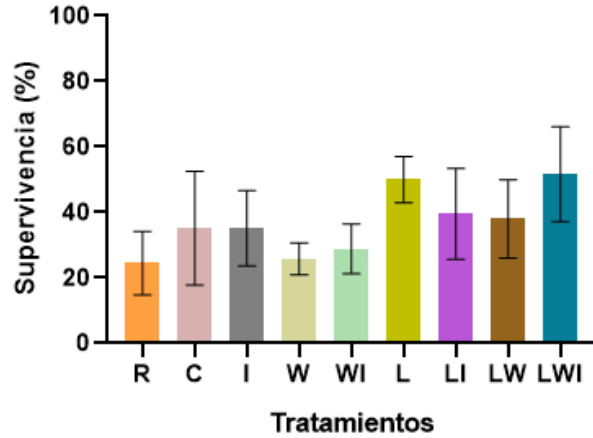


Figura 5. Supervivencia (%) de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos ($p=0.0586$). Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* + pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina.

8.5 Microbiota intestinal

8.5.1 Diversidad alfa

El esfuerzo de muestreo medido en curvas de rarefacción presentó variabilidad en las muestras, encontrándose ocho particularmente bajas: I1, W2, WI1, L2, L3, LI2, LWI2 y LWI4 (Figura 6), considerándose poco representativas.

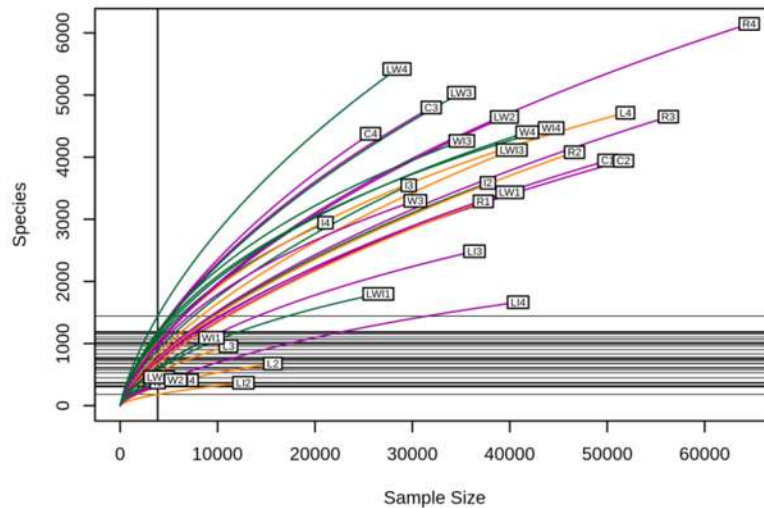


Figura 6. Curvas de rarefacción de OTUs al 97% de identidad observadas en la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos.

En general se obtuvieron valores altos de riqueza, en términos de los índices Chao1 y Shannon, que se muestran en la Figura 7 y anexo 13.3. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el estimador Chao1, donde las larvas suplementadas con *L.acidophilus*-inulina LI obtuvieron una riqueza menor con respecto al resto de los tratamientos, aunque no es muy claro. Por otro lado, el indicador Shannon no presentó diferencias estadísticas entre tratamientos.

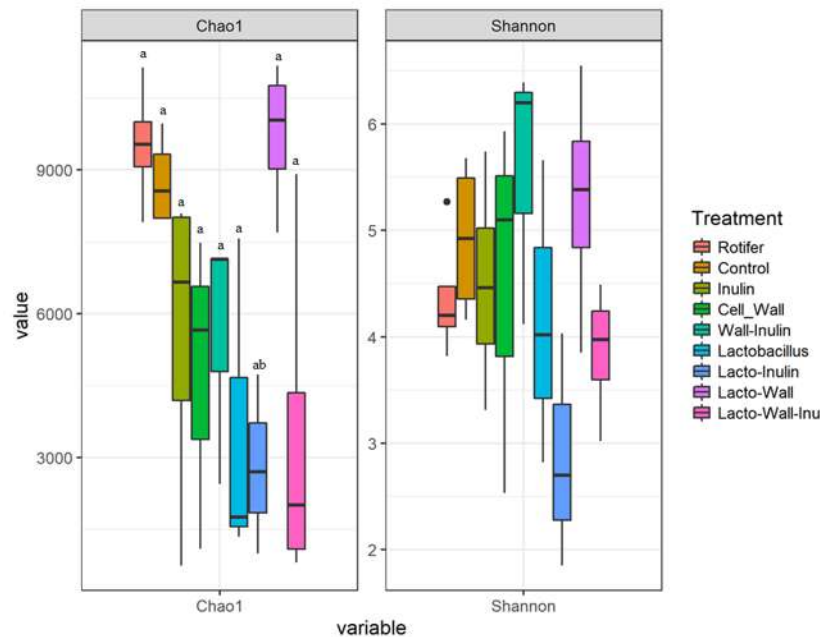


Figura 7. Alfa diversidad expresada en términos de los índices Chao1 y Shannon de la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Índices diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

8.5.2 Diversidad beta

La representación visual de la diversidad beta de los diferentes tratamientos mediante escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) exhibe en agrupamiento la mayoría de muestras mientras que otras se encuentran dispersas. Algunas de las muestras que están fuera de los elipses coinciden con las muestras con baja rarefacción y que se consideran poco representativas (I1, W2, LI2 y LWI2). Los tratamientos que se aprecian más dispersos son L, LI y LWI (Figura 8A).

Por otro lado, al hacer un acercamiento al agrupamiento, encontramos cinco grupos distinguibles: R, C, I, LW y W-WI. Este último conjunto engloba a los tratamientos W y WI que presentaron un comportamiento muy similar tanto en desempeño larvario como en supervivencia. Podemos observar que los grupos de los tratamientos rotífero (R) y microdieta control (C) se sobreponen, mientras que el resto de los agrupamientos están separados (Figura 8B).

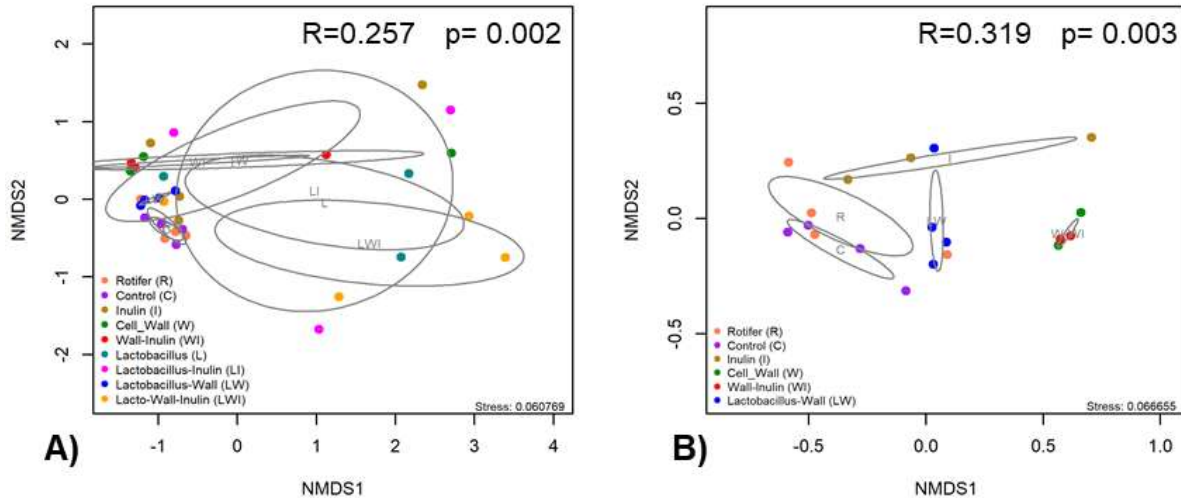


Figura 8. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS distancias Bray-Curtis) de la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos, donde A) representación del total de los tratamientos y B) acercamiento al grupo observable en la figura A.

Aunado a la representación visual, el análisis de similitudes (ANOSIM) sugiere que hay diferencias en las comunidades bacterianas entre tratamientos ($R= 0.319$, $p=0.003$). El análisis PERMANOVA Adonis muestra que aunque visualmente hay separación entre grupos, sólo la microbiota intestinal de las larvas suplementadas con pared celular y pared celular-inulina (W-WI) es diferente ($p<0.05$) del resto de los tratamientos (tabla 6).

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza multivariante permutacional PERMANOVA Adonis correspondiente al NMDS Figura 8B. * Indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

| Grupos comparados | R | p-valor | Grupos comparados | R | p-valor |
|-------------------|-------|---------|-------------------|-------|---------|
| R vs C | 0.132 | 0.268 | C vs W-WI | 0.530 | 0.027* |
| R vs I | 0.211 | 0.267 | C vs LW | 0.169 | 0.256 |
| R vs W-WI | 0.610 | 0.026* | I vs W-WI | 0.318 | 0.084* |
| R vs LW | 0.274 | 0.141 | I vs LW | 0.125 | 0.675 |
| C vs I | 0.155 | 0.436 | W-WI vs LW | 0.405 | 0.029* |

Donde: R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, LW= *L. acidophilus* - pared celular.

8.5.3 Composición de la microbiota

En las comunidades bacterianas del intestino se identificaron un total de 51 *phyla* de los cuales el dominante fue *Proteobacteria* con un 45.10%, seguido de *Planctomycetota* (14.92%), *Chloroflexi* (11.94%), *Acidobacteriota* (7.56%) y *Firmicutes* (5.84%), que en conjunto constituyen más del 85% (Figura 9). Esporádicamente se presentaron los *phyla* MBNT15, *Halanaerobiaeota*, *Elusimicrobiota*, *Caldisericota*, entre otros. Se adjunta la lista de los 15 *phyla* con mayor presencia (anexo 13.4).

Por su parte, a nivel de género se encontraron 584 géneros, donde los más abundantes fueron: *Providencia* (16%), *Nitrosomonas* (10.48%), *Uncultured_Xanthomonadacea* (9.55%), *Pasteurella* (6.73%), *Luteitalea* (3.51%) y *Brevundimonas* (3.51%), conformando el ~50% de la microbiota (Figura 10). En el anexo 13.5 se enlistan los 22 géneros con mayor prevalencia.

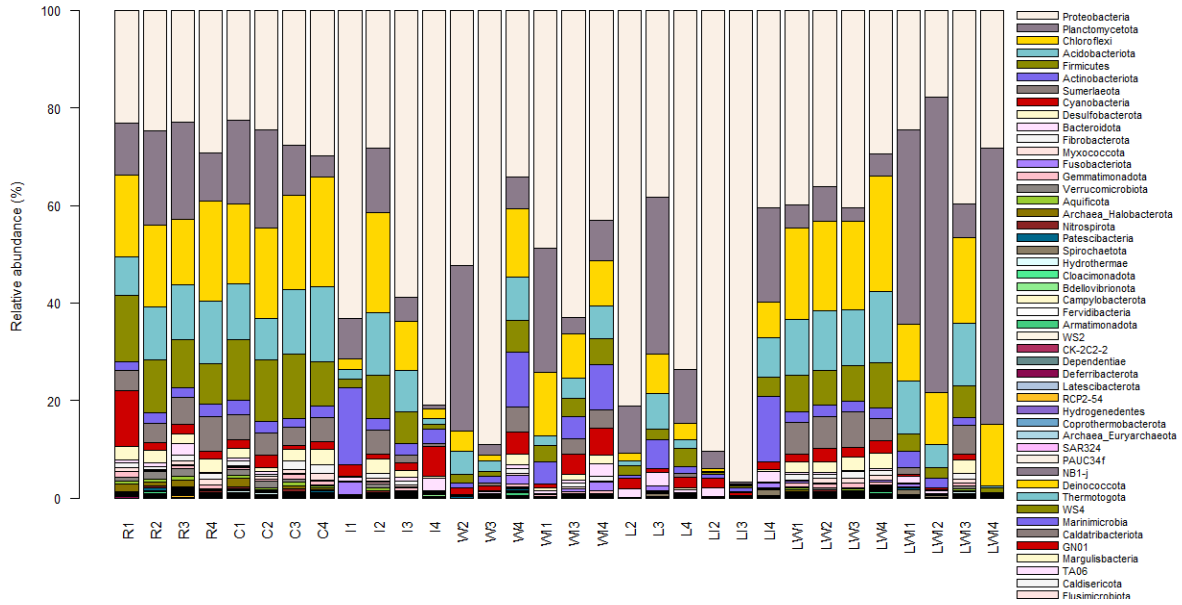


Figura 9. Abundancia relativa a nivel phylum de la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* + pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina.

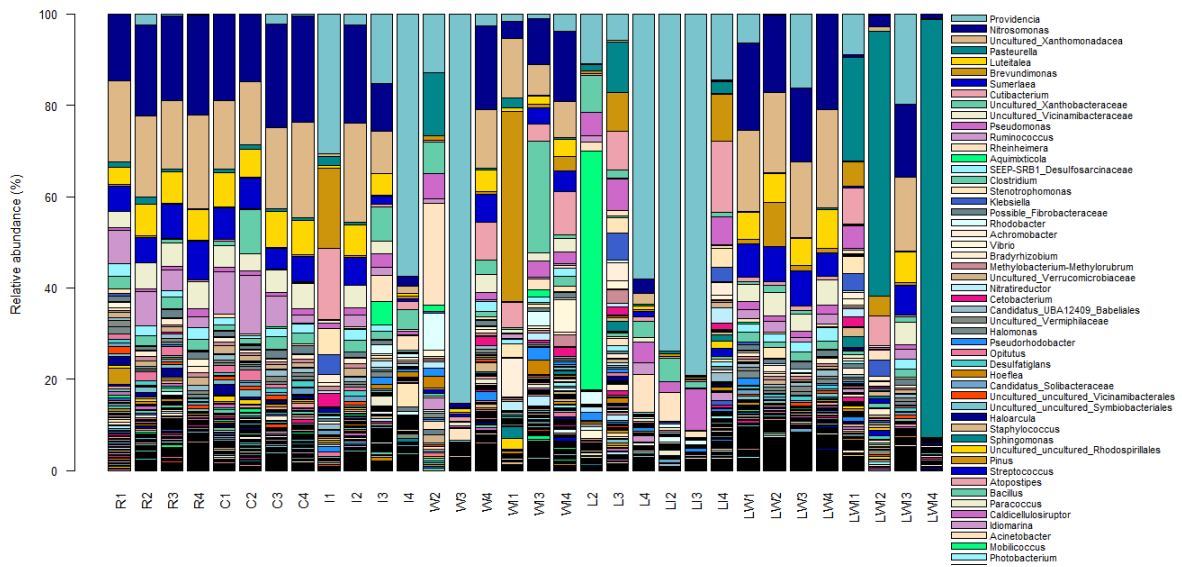


Figura 10. Abundancia relativa a nivel género de la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos. Donde R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* + pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina.

8.5.4 Abundancia diferencial de taxones

El análisis LEfSe a nivel phylum identificó 14 taxones diferencialmente abundantes en sólo cuatro de los tratamientos de alimentación, con puntuaciones LDA positivas entre ~3.9 y ~5.4. Siete de estos taxones se encontraron sobrerrepresentados en la microbiota intestinal de las larvas suplementadas con una combinación de *L. acidophilus*-pared celular (LW). El resto de los phyla se hallaron en los tratamientos microdieta testigo (C) (4), rotífero (R) (2) y *L. acidophilus*-inulina (LI) (1) (Figura 11).

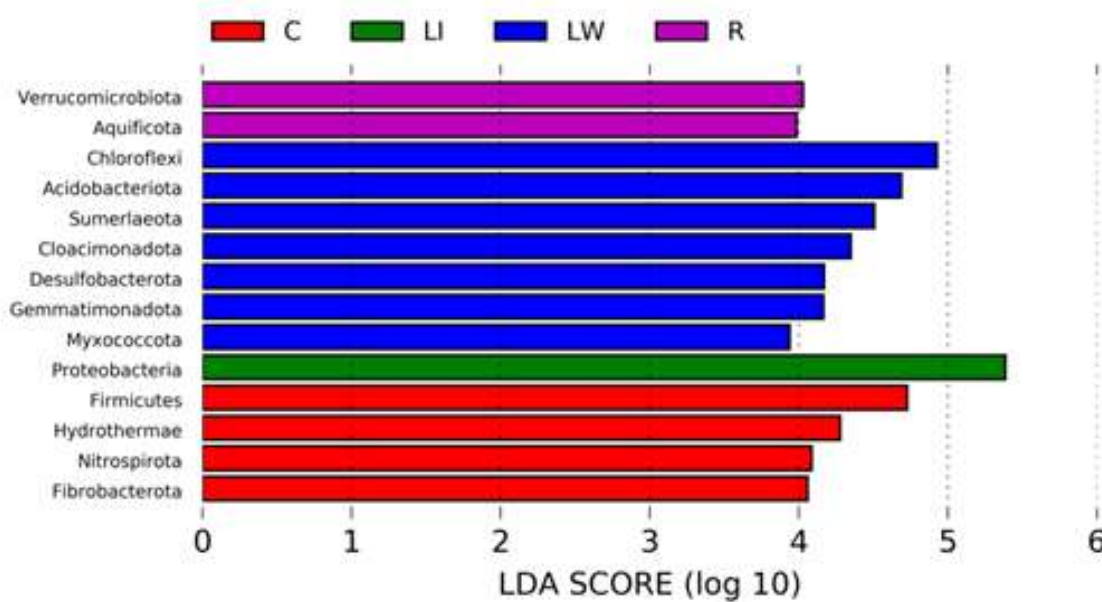


Figura 11. Phyla diferencialmente abundantes en la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos, determinados por un análisis discriminante lineal del tamaño del efecto (LEfSe) de todos los tratamientos de alimentación. Donde C= microdieta Testigo, LI= microdieta + *L. acidophilus* + inulina, LW= microdieta + *L. acidophilus* + pared celular y R= rotífero.

Por otro lado, a nivel género se encontraron 31 taxones diferencialmente abundantes en cinco de los nueve tratamientos. De estos tratamientos, ambos controles R y C mostraron el mayor número de taxones; 13 y 11, respectivamente. El resto de los tratamientos fueron *L. acidophilus*-pared celular (LW) (4), pared celular-inulina (WI) (2) y *L. acidophilus*-inulina (LI) (1) (Figura 12).

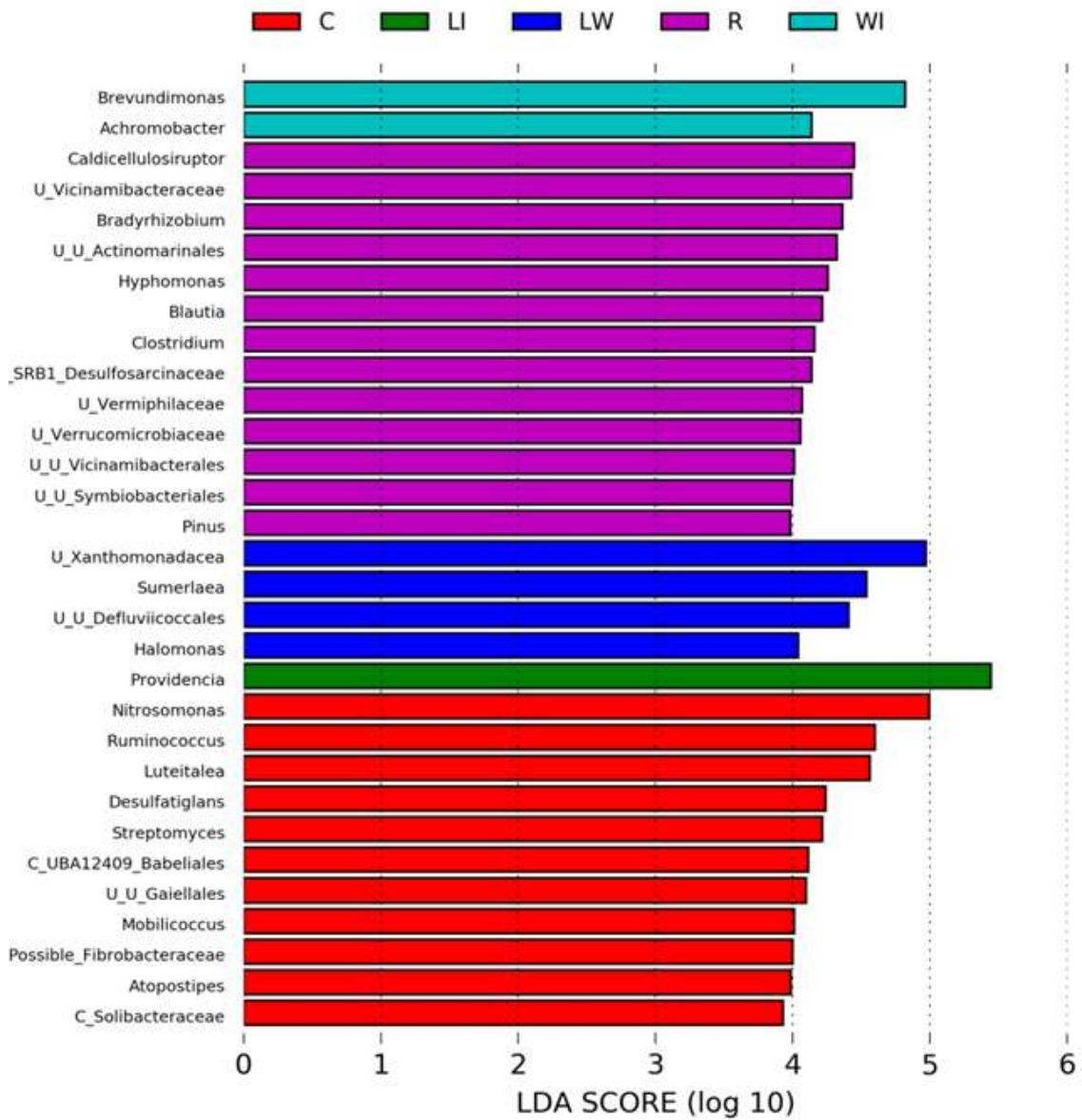
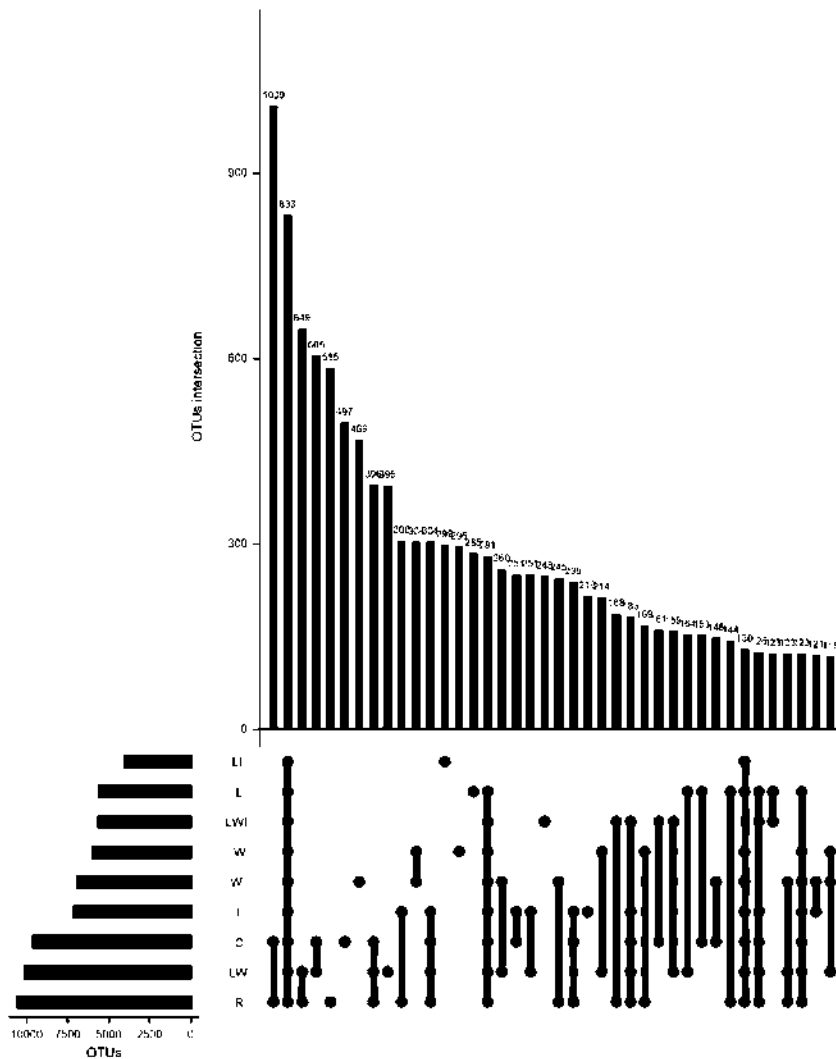


Figura 12. Géneros diferencialmente abundantes en la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos, determinados por un análisis discriminante lineal del tamaño del efecto (LEfSe) de todos los tratamientos de alimentación. Donde C= microdieta control, LI= microdieta + *L. acidophilus* + inulina, LW= microdieta + *L. acidophilus* + pared celular, R= rotífero y WI= microdieta + pared celular + inulina.

8.5.6 Microbiota única y compartida

Mediante gráficos de intersecciones (UpSet) se identificó la microbiota única y compartida por todos los tratamientos. Se encontró que los nueve tratamientos comparten 833 OTUs, además se observó que más de 1000 OTUs solo se encuentran en los tratamientos controles; rotífero (R) y microdieta control (C). Estos tratamientos también fueron los que mostraron un mayor número de OTUs únicos; 585 y 497, respectivamente (Figura 13).



A nivel de género, se identificaron 73 géneros presentes en todos los tratamientos, algunos de ellos: *Providencia*, *Nitrosomonas*, *Pasteurella*, *Luteitalea*, *Brevundimonas*, *Sumerlaea*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Cetobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, etc. (lista completa en anexo 13.6).

Además, todos los tratamientos, excepto el tratamiento microdieta control (C), presentaron géneros únicos, de los cuales inulina presentó el mayor número de géneros únicos (34) seguido de pared celular (31) (Figura 14).

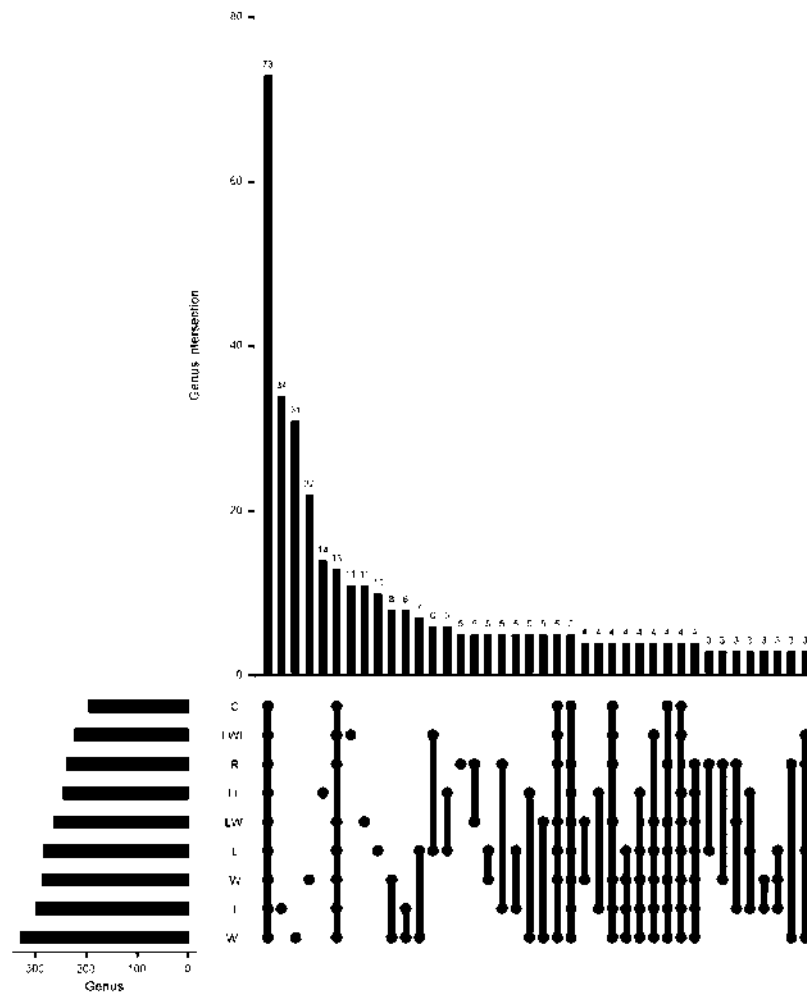


Figura 14. Gráfico de intersecciones UpSet que representa los géneros únicos y compartidos presentes en la microbiota intestinal de larvas de *C. estor* alimentadas durante 32 días con rotífero (*B. plicatilis*) y microdietas suplementadas con prebióticos y probióticos.

9. DISCUSIÓN

9.1 Evaluación del efecto de las microdietas suplementadas con probióticos y prebióticos en el crecimiento y supervivencia

El desarrollo de microdietas para la cría de larvas de peces es un objetivo importante en el establecimiento de la acuicultura comercial de muchas especies de peces y hasta que se logren desarrollar microdietas adecuadas capaces de reemplazar al zooplancton, la larvicultura dependerá del uso de presas vivas que son costosas y a menudo, no confiables en cuanto a suministro y calidad (Holt *et al.*, 2011; Langdon & Barrows, 2011).

El éxito del alimento vivo se le ha adjudicado a diversos factores tanto internos como externos, principalmente la búsqueda, identificación e ingestión, que depende de factores fisicoquímicos como el color, la forma, el movimiento, estímulo olfatorio, entre otros, además de secreciones atrayentes que son identificados por la larva y estimulan la respuesta de alimentación (Kolkovski, 2013; Kolkovski *et al.*, 1997). Un estudio reciente con larvas de *C. estor*, donde se evaluó el efecto nutrigenómico de la alimentación con microdietas *versus* rotífero reveló que este último sobreexpresa un número importante de genes involucrados en el crecimiento y digestión, promoviendo un crecimiento adecuado, lo que proporciona una visión más clara del porqué los rotíferos proporcionan mejores rendimientos. Por otro lado se observó que las larvas alimentadas con microdieta sobreexpresaron genes de inestabilidad celular, como genes inductores de apoptosis y estrés oxidativo, relacionados con daño mitocondrial y degradación de proteínas (Juárez-Gutiérrez *et al.*, 2021).

Una forma de aumentar la eficiencia de las dietas artificiales en el cultivo de larvas es el uso de aditivos como los probióticos y prebióticos, debido a que se ha demostrado que mejoran el crecimiento, el sistema inmune y modulan la microbiota intestinal de las especies cultivadas (Lazo, 2000; Ringø *et al.*, 2010; Amenyogbe *et al.*, 2020).

Uno de los probióticos de amplio estudio en acuicultura es la cepa *L. acidophilus*, de la cual diversos autores concluyen que mejora el crecimiento, la utilización de nutrientes y la supervivencia de especies en etapa larval como el bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Al-Dohail *et al.*, 2009) y el pez cola de espada (*Xiphophorus helleri*) (Hoseinifar *et al.*, 2015), así como en juveniles de bagre rayado (*Pangasionodon hypoththalmus*) (Akter *et al.*, 2019). Por otro lado, en tilapia (*O. niloticus*) no se detectaron aumentos en el crecimiento (Villamil *et al.*, 2014a), al igual que en la presente investigación donde las larvas que consumieron el probiótico solo o en conjunto con prebióticos alcanzaron un menor crecimiento.

La inulina de agave es otro de los suplementos utilizados que no surtieron efectos significativos en *C. estor* en fase larvaria, sin embargo los resultados no son claros, debido a que la microdieta suplementada con este prebiótico presentó un menor porcentaje de proteína (ver tabla 4). En otras especies como la lubina (*Lates calcarifer*) (Raffic Ali *et al.*, 2016) y tilapia (*O. niloticus*) (Zhou *et al.*, 2020) se observó una mejora en el crecimiento. Por otro lado, en juveniles de beluga (*Huso huso*) (Akrami *et a.*, 2009) y larvas de rodaballo (*Psetta maxima*) (Mahious *et al.*, 2006) y de carpa común (*Cyprinus carpio*) (Eshaghzadeh *et al.*, 2015), no se encontraron aumentos en el crecimiento.

A menudo, los probióticos y prebióticos son utilizados de manera conjunta, con la finalidad de proporcionar la ventaja de ambos en el desarrollo de los peces (Akrami *et al.*, 2013), debido a un efecto sinérgico (Gibson & Roberfroid, 1995).

En larvas de Pescado Blanco, el uso de *L. acidophilus* junto con inulina y/o pared celular (simbióticos) no mostraron ventajas tanto en crecimiento como en microbiota intestinal, caso contrario a lo observado en juveniles de la misma especie, donde en una investigación similar se determinó que los organismos presentaron mejores resultados en crecimiento con la combinación de *L. acidophilus* - pared celular y *L. acidophilus* - inulina (datos no publicados). Oliveira *et al.* (2020) tampoco observaron sinergia entre *B. subtilis* e inulina en larvas de surubí atigrado (*P. reticulatum*); está combinación no mostró efectos positivos sobre el crecimiento e histomorfometría intestinal de los peces, encontrándose

disminución de la altura y grosor de las vellosidades del intestino y menor espesor del epitelio ($p < 0.05$).

En las condiciones aquí expuestas, la suplementación probiótica y simbiótica no resultó ventajosa, lo que pudo deberse a varios factores como el tiempo de suplementación, las concentraciones utilizadas o la etapa fisiológica de la especie, pues estos factores varían de un estudio a otro. Además, es importante mencionar que estos tratamientos presentaron un mayor número de larvas supervivientes al término del experimento y por ende una mayor densidad de organismos, lo que pudiera estar enmascarando los resultados de desempeño.

En términos de crecimiento, los mejores pesos se alcanzaron con los tratamientos controles; rotífero (R) y microdieta control (C), y con las microdietas suplementadas con pared celular (W) y pared celular-inulina (WI), mientras que el crecimiento en longitud total fue superior en los organismos que consumieron rotífero (R) y microdieta enriquecida con pared celular-inulina (WI). Lo anterior sugiere que la mejor opción de suplementación para *Chirostoma estor* en fase larvaria es la combinación prebiótica pared celular-inulina, igualando el crecimiento con los organismos alimentados con rotíferos.

La pared celular de *S. cerevisiae* es un prebiótico interesante para la acuicultura, sin embargo es un suplemento relativamente poco probado en este sector. En tilapia (*O. niloticus*) se ha documentado que la pared celular promueve el crecimiento y optimiza la utilización del alimento, además de otros beneficios como resistencia a patógenos, cambios benéficos en el intestino y estimulación inespecífica del sistema inmune (Selim & Reda, 2015; Abu-Elala *et al.*, 2018; Márquez-Martínez, 2020). Una reciente experiencia donde se aplicó un suplemento comercial a base de pared celular de *S. cerevisiae* con enzimas fúngicas de *Trichoderma longibrachia* en juveniles de camarón blanco del pacífico (*P. vannamei*) reveló que en esta especie la supervivencia y el rendimiento se vieron beneficiados probablemente como resultado de la estimulación directa del sistema inmunológico por el alimento rico en polisacáridos, es decir, el β -glucano de la pared celular de la levadura junto con otros constituyentes como proteoglicanos y manano-oligosacáridos (MOS) (Servin-Arce *et al.*, 2021), lo que

posiblemente también haya sucedido en las larvas de *C. estor*, aunado a los cambios producidos en la microbiota intestinal.

Las concentraciones en que ha sido aplicada la pared celular de levadura van del 0.025% al 1.0% y el tiempo de aplicación oscila entre los 30 y 102 días. En esta investigación se aplicó la dosis y duración más bajos reportados (0.025% durante 32 días) y se obtuvieron resultados importantes, sin embargo desconocemos si estos resultados pudieran mejorar al aumentar estos parámetros, puesto que hasta el momento no se encontraron referencias con peces en etapa larvaria.

La supervivencia no se vio influenciada por los tratamientos de alimentación ($p > 0.05$), sin embargo de manera general se obtuvo una baja tasa (entre 24 y 51%) en comparación con otras investigaciones de este tipo realizadas con larvas de *C. estor* (Martínez-Ángeles, 2016; Monroy De la Peña, 2018), por una parte atribuido a la manipulación de la especie, que al ser un organismo altamente susceptible al estrés en cultivo por el manejo y los cambios en las condiciones ambientales, resulta en altas tasas de mortalidad (Martínez-Palacios *et al.*, 2002; Ríos-Durán *et al.*, 2006). Respecto a las condiciones ambientales, la temperatura juega un papel de gran impacto en los peces, que al ser animales ectotérmicos no pueden mantener una temperatura corporal constante y por ende la temperatura del entorno influye enormemente (Boltaña *et al.*, 2017). En el caso de las larvas de peces controla procesos bioquímicos fundamentales, repercutiendo directamente en las tasas de desarrollo y supervivencia (O'Connor *et al.*, 2007). En el Pescado blanco el intervalo óptimo de temperatura es de 22 a 25°C (Martínez-Palacios *et al.*, 2002a), sin embargo debido a que el ensayo de alimentación tuvo lugar en invierno, la temperatura del agua fluctuó entre los 15.17 y 20.75°C, que de acuerdo a los autores citados anteriormente se consideran bajas, por lo que se infiere que pudo afectar en las tasas de crecimiento y supervivencia obtenidas.

Aunque no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia, el mayor número de larvas al término del experimento se encontró en el tratamiento LWI, que también fue el tratamiento que presentó los pesos más bajos, lo que podría indicar una posible correlación entre ambas variables. Esto cobra sentido

dado que autores señalan que la densidad poblacional impacta en el crecimiento de los individuos (Lorenzen & Enberg, 2002), donde a densidades más altas se observa una ralentización del crecimiento (Matthias *et al.*, 2018).

9.2 Evaluación del efecto de los probióticos y prebióticos en la microbiota intestinal

La colonización intestinal comienza cuando el saco vitelino se consume y la boca se abre para la alimentación exógena (Egerton *et al.*, 2018). El establecimiento de la microbiota intestinal impacta aún más en el desarrollo inmunológico e histológico de las larvas de peces (Vadstein *et al.*, 2013), por lo que el desarrollo de una microbiota benéfica es crucial para la producción estable de larvas sanas (Deng *et al.*, 2022). La composición es variable, y depende de múltiples factores entre los que destacan la etapa de vida, dieta, entorno, nivel trófico, ubicación geográfica, temperatura, etcétera (Tarnecki *et al.*, 2017; Egerton *et al.*, 2018; Butt & Volkoff, 2019; Le *et al.*, 2020).

En su mayoría, los estudios sobre suplementación probiótica y prebiótica se centran en su influencia sobre el crecimiento, inmunidad e histología del intestino (Cerezuela *et al.*, 2013; Eshaghzadeh *et al.*, 2015; Selim & Reda, 2015; Raffic Ali *et al.*, 2016; Abu-Elala *et al.*, 2018; Akter *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2020). Sin embargo, las oportunidades en el área de estudio de estos ingredientes se derivan en gran parte de lo que podamos aprender sobre su influencia en la microbiota intestinal (Spacova *et al.*, 2020). Debido a ello en estudios recientes se ha empezado a abordar estos efectos y la posible manipulación de las comunidades microbianas mediante la suplementación dietética (Carballo *et al.*, 2019; Foyosal *et al.*, 2020; Márquez-Martínez, 2020; Servin Arce *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2022).

Se estima que en el intestino de los peces habitan alrededor 10^{7-11} bacterias g^{-1} (Nayak, 2010), aunque la composición de estas comunidades es controvertida (Romero *et al.*, 2014). Gracias a los enfoques moleculares, diversos autores coinciden en que más del 80% está compuesta de cinco *phyla* dominantes: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Fusobacteria (Nayak, 2010; Sullam *et al.*, 2012; Bledsoe *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018;

Yukgehnaish *et al.*, 2020; Borges *et al.*, 2021). Además de estos *phyla*, en larvas se han encontrado en gran abundancia Verrucomicrobia, Chloroflexi y Planctomycetota (Zhang *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2022), curiosamente, este último solo se ha encontrado esporádicamente en la microbiota larvaria del bacalao (*Gadus mohua*) (Bakke *et al.*, 2015). Esta composición varía entre especies, debido a factores propios de los organismos hospedadores (p.e., edad y genética), factores ambientales (p.e., estación del año y entorno) y factores microbianos (p.e., capacidad de adhesión) (Tarnecki *et al.*, 2017; Egerton *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Le *et al.*, 2020).

Nuestros resultados indican que la microbiota intestinal de las larvas de *C. estor* se encuentra dominada por Proteobacteria, Planctomycetota, Chloroflexi, Acidobacteriota y Firmicutes, formando más del 85%. Esto coincide con lo obtenido en un estudio reciente con larvas de tilapia (*O. niloticus*) donde se encontró que Proteobacteria, Actinobacteriota y Planctomycetota componen el 87% de la composición de la comunidad, además de otros *phyla* como Firmicutes, Fusobacteria, Verrucomicrobia y Chloroflexi (Deng *et al.*, 2022).

Como vimos anteriormente, uno de los factores que afectan a la estructura de la microbiota es la etapa fisiológica, cambiando considerablemente con la edad. Un ejemplo actual es el pez disco (*Symphysodon haraldi*) donde se observó un aumento constante de Firmicutes desde la etapa larvaria hasta la fase adulta, además de una disminución gradual de Chloroflexi y cambios en la abundancia de otros *phyla* (Zhang *et al.*, 2021). Este comportamiento es consistente con los hallazgos hechos en juveniles de Pescado blanco (datos no publicados) donde se encontró una mayor abundancia de Firmicutes (61%) y una menor presencia de otros *phyla* como Proteobacteria, Actinobacteria y Chloroflexi, con respecto a los resultados aquí presentados.

Algunos géneros reportados con mayor frecuencia en peces de agua dulce son *Aeromonas*, *Cetobacterium*, *Clostridium*, *Plesiomonas* y *Pseudomonas* (Romero *et al.*, 2014; Bledsoe *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2022). Sin embargo, estos taxones se encontraron en abundancias menores, identificándose como dominantes a *Providencia*, *Nitrosomonas*,

Uncultured_Xanthomonadaceae, *Pasteurella*, *Luteitalea*, *Brevundimonas*, *Sumerlaea*, *Cutibacterium*, Uncultured_Xanthobacteraceae, Uncultured_Vicinamibacteraceae, *Pseudomonas*, *Ruminococcus*, entre otros.

Como vemos, el género con mayor presencia es *Providencia*, sin embargo los informes en peces son poco frecuentes, se trata de un género asociado a insectos, considerándose como dominante en la microbiota intestinal de larvas de mosca común (*Musca domestica*) (Zhao *et al.*, 2017) y miembro natural de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Galac & Lazzaro, 2011). Comúnmente los reportes en peces describen al grupo como patógeno, sin embargo en estudios con carpa rohu (*Labeo rohita*) y carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) se determinó que pueden ser miembros de la microbiota normal de estos peces, llegando a ser patógena en condiciones específicas y por ende, oportunista para ellos (Jiang *et al.*, 2011; Ramkumar *et al.*, 2014).

La microbiota intestinal puede clasificarse en microbiota transitoria, asociada con los alimentos y la digesta y microbiota núcleo o central, que coloniza la superficie de la mucosa gastrointestinal (Romero *et al.*, 2014; Ringø *et al.*, 2016; Vargas-Albores *et al.*, 2021). En este estudio se distinguieron 73 géneros compartidos por todos los tratamientos (lista completa en anexo 13.6), de los cuales *Bacillus*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Streptococcus* también se identificaron como parte de la microbiota núcleo de juveniles de Pescado blanco (datos no publicados). Lo encontrado en larvas y en juveniles podría indicar la presencia de una microbiota central en *C. estor*, aunque definir una microbiota núcleo puede ser difícil (Tarnecki *et al.*, 2017).

En cuanto a diversidad alfa, los suplementos dietarios no siempre han generado efectos significativos (Shi *et al.*, 2020; Maas *et al.*, 2021; Servin Arce *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2022). Nuestros resultados muestran que en términos de índice de Chao1 se produjo una disminución de la riqueza en los individuos que consumieron *L. acidophilus*-inulina (LI) ($p < 0.05$), sin embargo no es muy claro, mientras que el índice de Shannon tomó valores entre 2.86 y 5.57 sin reflejar diferencias estadísticas. De manera general se obtuvieron altos valores en

contraste con lo reportado en larvas de otras especies, donde índices de Shannon oscilan entre 1.30 y 3.9 (Bakke *et al.*, 2013, 2015; Xia *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2022) y con respecto a estudios con juveniles y adultos de *C. estor*, uno de ellos recién publicado, donde se compara la microbiota intestinal de adultos de vida libre contra cultivados (Amillano-Cisneros *et al.*, 2022) y otro sobre suplementación prebiótica y simbiótica en juveniles por publicarse. Teniendo en cuenta que la diversidad microbiana en los organismos tiende a aumentar gradualmente con la edad, alcanzando un máximo cuando se acerca a la etapa juvenil (Borges *et al.*, 2021), probablemente como resultado de la diferenciación gastrointestinal (Vadstein *et al.*, 2018) y el aumento en la complejidad de los regímenes alimenticios (Ingerslev *et al.*, 2014), nuestros resultados sobresalen debido a que se estima que una mayor diversidad microbiana puede traer beneficios al huésped como una mayor probabilidad de tener características antagonicas para eliminar o controlar patógenos (Xiong *et al.*, 2019).

Por otro lado, la representación visual de la beta diversidad mediante NMDS sugirió disimilitud entre tratamientos, reforzado por el análisis estadístico (PERMANOVA Adonis) que indica que las comunidades bacterianas de las larvas suplementadas con los prebióticos pared celular (W) y pared celular-inulina (WI) son diferentes del resto de los tratamientos ($R= 0.319$, $p=0.003$).

La pared celular es un prebiótico de amplio uso en la industria avícola, capaz de reemplazar a los antibióticos en el alimento (Ahiwe *et al.*, 2021), atribuyéndole beneficios como promotor de crecimiento, producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), regulación del pH del colon, competencia contra patógenos por los receptores de la mucosa celular y aumento de bacterias benéficas como *Lactobacillus* y *Faecalibacterium* (Fowler *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016, 2017; Ahiwe *et al.*, 2021). En acuicultura es un ingrediente relativamente poco estudiado, principalmente con enfoques en crecimiento e inmunidad. Hasta donde tenemos conocimiento, sólo un par de investigaciones abordan los efectos de este suplemento en la microbiota intestinal de especies de interés acuícola: la tilapia (*O. niloticus*) y el camarón blanco del pacífico (*P. vannamei*). En la experiencia con tilapia, se observó una posible modulación de la microbiota intestinal (Márquez-

Martínez, 2020); sin embargo, la autora no lo describe a profundidad. Por su parte, en el caso del camarón se observaron diferencias en la composición de la microbiota intestinal, aumentando significativamente la abundancia relativa del género probiótico *Bacillus*, además de *Sphingobium*, en ambos niveles de inclusión; 0.5 % o 1.0%. Asimismo, en el análisis LEfSe este último género se vio diferencialmente enriquecido y con la mayor puntuación LDA en el grupo del 1.0%. Algunos autores sugieren que este género tiene una gran relevancia y podría explicar parte de las diferencias entre este tratamiento (Servin-Arce *et al.*, 2021).

Por otro lado, la inulina constituye uno de los prebióticos más probados en múltiples organismos, incluidos los peces. Los primeros estudios que evaluaron sus efectos en la microbiota intestinal de peces se basaron en técnicas de cultivo y se realizaron hace más de 15 años. En ellos se encontró que a un nivel de inclusión del 2% en larvas de rodaballo (*Psetta maxima* L.) hubo un aumento de las poblaciones de *Vibrio sp.* (Mahious *et al.*, 2006), mientras que a una concentración del 15% en *Salvenilus alpinus* hubo una disminución de los recuentos viables totales y alteraciones en la microbiota adherente (Ringø *et al.*, 2006). En este estudio, al usar inulina de agave no se observaron efectos de interés, sin embargo al combinarla con pared celular se obtuvieron efectos significativos en las comunidades microbianas.

Al analizar la abundancia diferencial a nivel género, mediante el análisis LefSe, encontramos que cinco de los nueve tratamientos de alimentación mostraron taxones diferencialmente enriquecidos. Uno de estos fue precisamente el tratamiento pared celular-inulina (WI), donde se vieron sobrerrepresentados dos géneros de interés; *Brevundimonas* y *Achromobacter*. Las *Brevundimonas* son bacterias acuáticas típicas que constituyen uno de los géneros dominantes en carpas como *Ctenopharyngodon idella*, *Carassius auratus* e *Hypophthalmichthys molitrix* (Li *et al.*, 2014). Se considera como un grupo potencialmente productor de carotenoides como la astaxantina, antioxidante ampliamente utilizado en dietas (Asker *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). Además, los resultados también sugieren que este género forma parte de la microbiota central de las larvas de *C. estor*.

Por otro lado, *Achromobacter* ha sido reportado en otras especies de peces como la tilapia (*O. niloticus*), el jurel (*Seriola lalandi*) y el salmón del atlántico (*Salmo salar*) en el cual se considera parte de la microbiota núcleo (Dehler *et al.*, 2017; Soriano *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2018, 2019). En el caso de *C. estor*, en una investigación por publicar se encontró un aumento de estas bacterias en juveniles suplementados con inulina de agave, *L. acidophilus*-inulina o *L. acidophilus*-pared celular. Se ha informado que este género tiene potencial celulolítico (Dar *et al.*, 2015) y como productor de quitinasa en conjunto con N-acetil-D-glucosamina (Subramanian *et al.*, 2020). El enriquecimiento de estos grupos bacterianos podría explicar parte de los resultados obtenidos en el rendimiento de los organismos, debido a su potencial benéfico para los peces.

Pese a la evidencia existente de que la adición de probióticos surte efectos positivos en el desempeño y microbiota de especies acuáticas, en la presente investigación la respuesta obtenida no fue la esperada, sin embargo no descartamos la posibilidad de que los resultados obtenidos hayan sido afectados por otros factores como la viabilidad de la cepa al momento del ensayo o bien, debido a la cantidad de secuencias obtenidas en algunas de las muestras pertenecientes a estos grupos.

10. CONCLUSIONES

- En términos de crecimiento en peso, las larvas alimentadas con rotíferos, microdieta control, y microdietas suplementadas con los prebióticos pared celular y pared celular-inulina obtuvieron mejores resultados.
- La supervivencia de los organismos no se vio afectada por los tratamientos de alimentación.
- La suplementación con el probiótico *L. acidophilus* y con una mezcla de este con los prebióticos utilizados no mostraron efectos significativos en desempeño o microbiota intestinal, sin embargo los resultados no son contundentes, pudiendo estar enmascarados por factores intrínsecos.
- La inulina de agave no mostró resultados favorables en crecimiento y microbiota intestinal, no obstante no descartamos la posibilidad de que estos resultados se hayan visto influenciados por el menor contenido de proteína en dicha dieta. Por otro lado, al aplicarla en conjunto con pared celular de levadura, los efectos en rendimiento y microbiota intestinal mejoraron sustancialmente.
- La microbiota intestinal de las larvas que consumieron pared celular y pared celular-inulina se vio influenciada significativamente por estos suplementos.
- La adición de pared celular-inulina enriqueció diferencialmente a dos géneros benéficos; *Brevundimonas*, potencial productor de astaxantina, y *Achromobacter*, con potencial celulolítico. En este sentido, la combinación de ambos prebióticos mostró ser una buena opción de suplementación para las larvas de *C. estor*.
- Con base en lo obtenido y considerando que la aplicación de prebióticos es más simple que el uso de bacterias vivas, optamos por la suplementación dietética del Pescado blanco en fase larvaria con una mezcla de pared celular de *S. cerevisiae* e inulina de agave.

11. RECOMENDACIONES

- En los futuros estudios sobre comunidades microbianas es importante dilucidar la funcionalidad de los microbiomas, en este sentido, complementar las investigaciones sobre microbiota intestinal del Pescado blanco con otros enfoques ómicos como la transcriptómica, proteómica y metabolómica, es necesario para comprender esta compleja relación.
- Considerando que, la suplementación prebiótica con la mezcla de pared celular e inulina generó buenos resultados en desempeño larvario y en microbiota intestinal, se deben dirigir esfuerzos a evaluar el costo-beneficio de la inclusión de estos en el cultivo del *C. estor*.
- Finalmente, sería interesante evaluar los efectos de la combinación de estos prebióticos en otros aspectos de importancia, como la morfología intestinal e inmunidad de la especie.

12. BIBLIOGRAFÍA

- 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. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(4), 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.11.001>
- Aguilar-Uscanga, B., & François, J. m. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 268–274. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>
- Ahiwe, E. U., Tedeschi Dos Santos, T. T., Graham, H., & Iji, P. A. (2021). Can probiotic or prebiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) serve as alternatives to in-feed antibiotics for healthy or disease-challenged broiler chickens?: A review. *Journal of Applied Poultry Research*, 30(3), 100164. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2021.100164>
- Akrami, R., 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). *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(6), 771–779. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00297.x>
- 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 Immunology*, 35(4), 1235–1239. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.039>
- Akter, Mst. N., Hashim, R., Sutriana, A., Siti Azizah, M. N., & Asaduzzaman, Md. (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*, 50(3), 786–797. <https://doi.org/10.1111/are.13938>
- Al-Dohail, M. A., Hashim, R., & 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(14), 1642–1652. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02265.x>
- 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. *Aquaculture International*, 28(3), 1017–1041. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00509-0>
- Bakke-McKellep, A. M., Penn, M. H., Salas, P. M., Refstie, S., Sperstad, S., Landsverk, T., Ringø, E., & Kroghdahl, Å. (2007). Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on

- intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 97(4), 699–713. <https://doi.org/10.1017/S0007114507381397>
- Barriga-Sosa, I. de los Á. (2018). Identidad genética y estatus actual de la diversidad del pescado blanco, *Chirostoma estor estor* (Jordan, 1879). En *El pescado blanco en la historia, la ciencia y la cultura michoacana* (p. 341). Gobierno del estado de Michoacán, Secretaría de Cultura: UMSNH, Instituto de Investigaciones Históricas.
- Bates, J. M., Mittge, E. K., Kuhlman, J., Baden, K. N., Cheesman, S. E., & Guillemin, K. (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.006>
- Bledsoe, J. W., Peterson, B. C., Swanson, K. S., & Small, B. C. (2016). Ontogenetic Characterization of the Intestinal Microbiota of Channel Catfish through 16S rRNA Gene Sequencing Reveals Insights on Temporal Shifts and the Influence of Environmental Microbes. *PLoS ONE*, 11(11), e0166379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166379>
- Boltaña, S., Sanhueza, N., Aguilar, A., Gallardo-Escarate, C., Arriagada, G., Valdes, J. A., Soto, D., & Quiñones, R. A. (2017). Influences of thermal environment on fish growth. *Ecology and Evolution*, 7(17), 6814–6825. <https://doi.org/10.1002/ece3.3239>
- Butt, R. L., & Volkoff, H. (2019). Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Frontiers in Endocrinology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>
- Cahu, C., & Zambonino-Infante, J. (2001). Substitution of live food by formulated in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200, 161–180. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00699-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00699-8)
- Campos-Mendoza, A. (2000). *Comparación del crecimiento de tres especies de género Chirostoma (Pisces: Atherinidae), en cultivo experimental dentro de sistemas parciales de recirculación de agua*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Carballo, C., Pinto, P. I. S., Mateus, A. P., Berbel, C., Guerreiro, C. C., Martinez-Blanch, J. F., Codoñer, F. M., Mantecon, L., Power, D. M., & Manchado, M. (2019). Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.044>
- 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 Immunology*, 34(5), 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.015>
- Corona-Herrera, G. A. (2017). *El efecto del fotoperiodo en el crecimiento, alimentación y determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro Chirostoma estor (Jordan, 1880)*. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/3732
- de Bruijn, I., Liu, Y., Wiegertjes, G. F., & Raaijmakers, J. M. (2018). Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiology Ecology*,

- 94(1). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix161>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The Gut Microbiota of Marine Fish. *Frontiers in Microbiology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- Eshaghzadeh, H., Hoseinifar, S. h., Vahabzadeh, H., & Ringø, E. (2015). The effects of dietary inulin on growth performances, survival and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Aquaculture Nutrition*, 21(2), 242–247. <https://doi.org/10.1111/anu.12155>
- FAO/OMS. (2001). *Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fernández-Díaz, C., Pascual, E., & Yúfera, M. (1994). Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Marine Biology*, 118(2), 323–328. <https://doi.org/10.1007/BF00349800>
- Fonseca-Madrigal, J., Navarro, J. C., Hontoria, F., Tocher, D. R., Martínez-Palacios, C. A., & Monroig, Ó. (2014). Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: Characterization of $\Delta 4$ and $\Delta 6\Delta 5$ desaturases of *Chirostoma estor[S]*. *Journal of Lipid Research*, 55(7), 1408–1419. <https://doi.org/10.1194/jlr.M049791>
- Foyzal, M. J., Fotedar, R., Siddik, M. A. B., & Tay, A. (2020). Lactobacillus acidophilus and L. plantarum improve health status, modulate gut microbiota and innate immune response of marron (*Cherax cainii*). *Scientific Reports*, 10(1), 5916. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62655-y>
- Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- 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. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., & Enes, P. (2018). Prebiotics as functional ingredients: Focus on Mediterranean fish aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 800–832. <https://doi.org/10.1111/raq.12201>
- Hai, N. v. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917–935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- Hasan, K. N., & Banerjee, G. (2020). Recent studies on probiotics as beneficial mediator in

- aquaculture: A review. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s41936-020-00190-y>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Holt, G. J., Webb, K. A., & Rust, M. B. (2011). Microparticulate diets: Testing and evaluating success. En *Larvae Fish Nutrition* (First Edition, pp. 353–372). John Wiley & Sons.
- Hoseinifar, S. H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A., & Vakili, F. (2015). The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish & Shellfish Immunology*, 42(2), 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.003>
- 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 Genetics*, 4(11), e1000255. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255>
- INAPESCA. (2018, marzo 22). *Acuacultura Pescado blanco*. Acuacultura Pescado blanco. <http://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-pescado-blanco>
- Infante-Villamil, S., Huerlimann, R., & Jerry, D. R. (2021). Microbiome diversity and dysbiosis in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 1077–1096. <https://doi.org/10.1111/raq.12513>
- Johny, T. K., Puthusseri, R. M., & Bhat, S. G. (2021). A primer on metagenomics and next-generation sequencing in fish gut microbiome research. *Aquaculture Research*, 52(10), 4574–4600. <https://doi.org/10.1111/are.15373>
- Juárez-Gutiérrez, M. E. (2020). *Nutrigenómica de larvas de pescado blanco de Pátzcuaro (Chirostoma estor) alimentadas con alimento vivo y microdietas* [Maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/DGB_UMICH/1916/1/IIAF-M-2020-0327.pdf
- Juárez-Gutiérrez, M. E., Navarrete-Ramírez, P., Monroy de la Peña, F. A., Llera-Herrera, R. A., Martínez-Chávez, C. C., Ríos-Durán, M. G., Palomera-Sanchez, Z., Raggi, L., Lozano-Olvera, R., Pedroza-Islas, R., & Martínez-Palacios, C. A. (2021). Using nutrigenomics to evaluate microdiet performance in pike silverside larvae. *Aquaculture Nutrition*, 27(5), 1659–1670. <https://doi.org/10.1111/anu.13305>
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in

- Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 239–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x>
- Kolkovski, S. (2013). 6 - Microdiets as alternatives to live feeds for fish larvae in aquaculture: Improving the efficiency of feed particle utilization. En G. Allan & G. Burnell (Eds.), *Advances in Aquaculture Hatchery Technology* (pp. 203–222). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.203>
- Kolkovski, S., Tandler, A., & Izquierdo, M. S. (1997). Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 148(4), 313–322. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01366-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01366-X)
- Langdon, C., & Barrows, R. (2011). Microparticulate Diets: Technology. En *Larval Fish Nutrition* (pp. 335–351). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470959862.ch12>
- Lazo, J. P. (2000). Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.*, 13.
- 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. *Scientific Reports*, 6(1), 24340. <https://doi.org/10.1038/srep24340>
- López Nadal, A., Ikeda-Ohtsubo, W., Sipkema, D., Peggs, D., McGurk, C., Forlenza, M., Wiegertjes, G. F., & Brugman, S. (2020). Feed, Microbiota, and Gut Immunity: Using the Zebrafish Model to Understand Fish Health. *Frontiers in Immunology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00114>
- Lorenzen, K., & Enberg, K. (2002). Density-dependent growth as a key mechanism in the regulation of fish populations: Evidence from among-population comparisons. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1486), 49–54. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1853>
- Mahious, A. S., Gatesoupe, F. J., Hervi, M., Metailler, R., & Ollevier, F. (2006). Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture International*, 14(3), 219. <https://doi.org/10.1007/s10499-005-9003-4>
- Márquez-Martínez, Y. Y. (2020). *Efecto de la alimentación suplementada con beta-glucanos aislados y pared celular de Saccharomyces cerevisiae en la microbiota intestinal de la tilapia (Oreochromis niloticus) y su desempeño en cultivo* [Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/1920/IIAF-M-2020-0403.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Martínez-Ángeles, E. (2016). *Uso de microagregados como primer alimento en larvas de pez blanco (Chirostoma estor)* [Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1898
- Martínez-Ángeles, E., Castillo-Quintana, E., Navarrete-Ramírez, P., Ríos-Durán, M. G., Martínez-

- Chávez, C. C., Raggi, L., Pedroza-Islas, R., Olvera-Novoa, M. A., & Martínez-Palacios, C. A. (2022). Effects of formulated microdiets on weaning success and larval performance of pike silverside *Chirostoma estor* (Jordan, 1879). *Animal Feed Science and Technology*, 288, 115288. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115288>
- Martínez-Palacios, C. A., Concha-Santos, S., Toledo-Cuevas, E. M., Ríos-Durán, M. G., Martínez-Chávez, C. C., Navarrete-Ramírez, P., Raggi, L., Strussmann, C., Hualde, J. P., Demicheli, M. A., & Fonseca-Madrugal, J. (2020). High levels of docosahexaenoic acid are present in eight New World silversides (Pisces: Atherinopsidae). *Neotropical Ichthyology*, 18(2), e190089. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2019-0089>
- Martínez-Palacios, C. A., Racotta, I. S., Ríos-Durán, M. G., Palacios, E., Toledo-Cuevas, M., & Ross, L. G. (2006). Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). *BIOCELL*, 30(1), 12.
- Martínez-Palacios, C. A., Ríos-Durán, M. G., Campos-Mendoza, A., Toledo-Cuevas, M., & Ross, L. G. (2002). Avances en el Cultivo del Pescado Blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Avances de Nutrición Acuícola VI, Cancún, Quintana Roo, México.
- Martínez-Palacios, C. A., Ríos-Durán, M. G., Madrugal, J. F., Cuevas, M. T., López, A. S., & Ross, L. G. (2008). Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880. *Aquaculture Research*, 39(7), 738–747.
- Martínez-Porchas, M., & Vargas-Albores, F. (2017). Microbial metagenomics in aquaculture: A potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture*, 9(1), 42–56. <https://doi.org/10.1111/raq.12102>
- Martínez-Palacios, C. A., Barriga Tovar, E., Taylor, J. F., Ríos Durán, G., & Ross, L. G. (2002a). Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture*, 209(1), 369–377. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00873-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00873-0)
- Matthias, B. G., Ahrens, R. N. M., Allen, M. S., Tuten, T., Siders, Z. A., & Wilson, K. L. (2018). Understanding the effects of density and environmental variability on the process of fish growth. *Fisheries Research*, 198, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.08.018>
- Meena, D. K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S. C., Prusty, A. K., Singh, S. K., Akhtar, M. S., Behera, B. K., Kumar, K., Pal, A. K., & Mukherjee, S. C. (2013). Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(3), 431–457. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9710-5>
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Børgwald, J., Castex, M., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>
- Mills, S., Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciroso-Pérez, J., Gómez, A., Hagiwara, A., Galindo, K. H.,

- Jersabek, C. D., Malekzadeh-Viayeh, R., Leasi, F., Lee, J.-S., Mark Welch, D. B., Papakostas, S., Riss, S., Segers, H., Serra, M., Shiel, R., Smolak, R., Snell, T. W., Stelzer, C.-P., ... Walsh, E. J. (2017). Fifteen species in one: Deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia*, 796(1), 39–58. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2725-7>
- Monroy De la Peña, F. A. (2018). *Evaluación del efecto del ácido alfa-lipoico en el crecimiento y la supervivencia de larvas de pez blanco de Pátzcuaro (Chirostoma estor)* [Tesis de pregrado]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Niness, K. R. (1999). Inulin and Oligofructose: What Are They? *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1402S–1406S. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1402S>
- O'Connor, M. I., Bruno, J. F., Gaines, S. D., Halpern, B. S., Lester, S. E., Kinlan, B. P., & Weiss, J. M. (2007). Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), 1266–1271. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603422104>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2019). *vegan: Community Ecology Package* (R package version 2.5-6) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Oliveira, F., Kasai, R. Y., Fernandes, C. E., Souza, W., & Meldau de Campos, C. (2020). *Probiotic, prebiotic and synbiotics supplementation on growth performance and intestinal histomorphometry Pseudoplatystoma reticulatum larvae: Journal of Applied Aquaculture: Vol 0, No 0*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10454438.2020.1841060?journalCode=wjaa20>
- Olsen, R. E., Myklebust, R., Kryvi, H., Mayhew, T. M., & Ringø, E. (2001). Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research*, 32(11), 931–934. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00626.x>
- Ortiz-Estrada, Á. M., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., & Martínez-Porchas, M. (2019). Predictive functional profiles using metagenomic 16S rRNA data: A novel approach to understanding the microbial ecology of aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 234–245. <https://doi.org/10.1111/raq.12237>
- R Core Team. (2020). *R: The R Project for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
- Raffic Ali, S. S., Ambasankar, K., Nandakumar, S., Praveena, P. E., & Syamadaya, J. (2016). Effect of dietary prebiotic inulin on growth, body composition and gut microbiota of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Animal Feed Science and Technology*, 217, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.04.011>

- Ringø, E., Dimitroglou, A., Hoseinifar, S. H., & Davies, S. J. (2014). Prebiotics in Finfish: An Update. En *Aquaculture Nutrition* (pp. 360–400). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch14>
- 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, 1818. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>
- Ringø, E., Olsen, R. e., Gifstad, T. ø., Dalmo, R. a., Amlund, H., Hemre, G.-I., & Bakke, A. m. (2010). Prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Mayhew, T. M., & Olsen, R. E. (2006). The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research*, 37(9), 891–897. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01509.x>
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. h., Soltani, M., Hoseinifar, S. h., Harikrishnan, R., & Song, S. k. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: Interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 129(1), 116–136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. I. g., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., Olsen, R. e., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. I., Martinsen, L. I., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., & Merrifield, D. I. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Ríos-Durán, M. G., Navarrete-Ramírez, P., Fonseca-Madrigal, J., Méndez-Ortiz, E., Palacios, E., Racotta, I. S., Martínez-Chávez, C. C., Ross, L. G., & Martínez-Palacios, C. A. (2016). Optimizing initial feeding of the Pike silverside *Chirostoma estor*: Oil droplet depletion, point of no return, growth and fatty acid utilization in larvae fed enriched rotifers. *Aquaculture Nutrition*, 22(3), 517–526. <https://doi.org/10.1111/anu.12272>
- Ross, L. G., Martínez-Palacios, C. A., Valdez, M. del C. A., Beveridge, M. C. M., & Sanchez, M. C. C. (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(6), 1782–1794. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01061.x>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Selim, K. M., & Reda, R. M. (2015). Beta-Glucans and Mannan Oligosaccharides Enhance Growth and Immunity in Nile Tilapia. *North American Journal of Aquaculture*, 77(1), 22–30. <https://doi.org/10.1080/15222055.2014.951812>
- Servin-Arce, K., de Souza Valente, C., do Vale Pereira, G., Shapira, B., & Davies, S. J. (2021).

- Modulation of the gut microbiota of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931) by dietary inclusion of a functional yeast cell wall-based additive. *Aquaculture Nutrition*, 27(4), 1114–1127. <https://doi.org/10.1111/anu.13252>
- Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., & Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>
- Soto-Galera, E., Espinosa-Pérez, H. & Mercado-Silva, N. 2019. *Chirostoma estor*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019: e.T191151A1971275. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T191151A1971275.en>. Accedido el 19 Agosto 2022.
- Spacova, I., Dodiya, H. B., Happel, A.-U., Strain, C., Vandenneuvel, D., Wang, X., & Reid, G. (2020). Future of Probiotics and Prebiotics and the Implications for Early Career Researchers. *Frontiers in Microbiology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01400>
- Takeuchi, T., Wang, Q., Furuita, H., Hirota, T., Ishida, S., & Hayasawa, H. (2003). Development of microparticle diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Fisheries science*, 69(3), 547–554. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00655.x>
- Tarnecki, A. M., Burgos, F. A., Ray, C. L., & Arias, C. R. (2017). Fish intestinal microbiome: Diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *Journal of Applied Microbiology*, 123(1), 2–17. <https://doi.org/10.1111/jam.13415>
- Vargas-Albores, F., Martínez-Córdova, L. R., Hernández-Mendoza, A., Cicala, F., Lago-Lestón, A., & Martínez-Porchas, M. (2021). Therapeutic modulation of fish gut microbiota, a feasible strategy for aquaculture? *Aquaculture*, 544, 737050. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737050>
- Villamil, L., Reyes, C., & Martínez-Silva, M. A. (2014a). In vivo and in vitro assessment of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic for tilapia (*Oreochromis niloticus*, Perciformes:Cichlidae) culture improvement. *Aquaculture Research*, 45(7), 1116–1125. <https://doi.org/10.1111/are.12051>
- Villamil, L., Reyes, C., & Martínez-Silva, M. A. (2014b). In vivo and in vitro assessment of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic for tilapia (*Oreochromis niloticus*, Perciformes:Cichlidae) culture improvement. *Aquaculture Research*, 45(7), 1116–1125. <https://doi.org/10.1111/are.12051>
- Wang, A. R., Ran, C., Ringø, E., & Zhou, Z. G. (2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 626–640. <https://doi.org/10.1111/raq.12191>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B. A., & Arockiaraj, J. (2020a). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: Factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1903–1927. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B. A., &

- Arockiaraj, J. (2020b). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: Factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1903–1927. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>
- Zhou, L., Zhang, J., Yan, M., Tang, S., Wang, X., Qin, J. G., Chen, L., & Li, E. (2020). Inulin alleviates hypersaline-stress induced oxidative stress and dysbiosis of gut microbiota in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 529, 735681. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735681>
- Zhou, Z., Yao, B., Romero, J., Waines, P., Ringø, E., Emery, M., Liles, M. R., & Merrifield, D. L. (2014). Methodological Approaches Used to Assess Fish Gastrointestinal Communities. En *Aquaculture Nutrition* (pp. 101–127). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch5>

13. ANEXOS

13.1 Resultados más relevantes del uso de probióticos y prebióticos en organismos acuáticos

| Espece y etapa fisiológica | Concentración y duración | Efectos | Fuente |
|---|--|--|-----------------------------------|
| Tilapia (<i>O. niloticus</i>) | <i>L. acidophilus</i> 10 ⁶ UFC g ⁻¹ 15 días | ↔ peso ↔ supervivencia ↑ resistencia a patógenos (<i>A. hydrophila</i> y <i>S. agalactiae</i>) | (Villamil <i>et al.</i> , 2014b) |
| Pez cola de espada (<i>Xiphophorus helleri</i>) Larvas | <i>L. acidophilus</i> 1.5 x 10 ⁸ , 3 x 10 ⁸ y 6 x 10 ⁸ UFC g ⁻¹ 10 semanas | ↑ GDP, TCE y FCR ↑ resistencia al estrés por salinidad ↑ BAL ↑ respuesta inmune de la mucosidad de la piel Dosis óptima: 6 x 10 ⁸ UFC g ⁻¹ | (Hoseinifar <i>et al.</i> , 2015) |
| Bagre rayado (<i>Pangasionodon hypophthalmus</i>) Juveniles | <i>L. acidophilus</i> 10 ³ , 10 ⁵ , 10 ⁷ y 10 ⁹ UFC g ⁻¹ 12 semanas | ↑ [10 ⁵ y 10 ⁷ UFC g ⁻¹] GDP, TCE, PER y digestibilidad de proteína ↑ [10 ⁷ UFC g ⁻¹] actividad de amilasa, proteasa y lipasa ↑ [10 ⁵ y 10 ⁷ UFC g ⁻¹] vellosidades intestinales Dosis óptima: 10 ⁵ UFC g ⁻¹ | (Akter <i>et al.</i> , 2019) |
| Cangrejo de río (<i>Cherax cainii</i>) | <i>L. acidophilus</i> y <i>L. plantarum</i> 10 ⁹ UFC mL ⁻¹ 60 días | ↔ peso ↑ diversidad alfa (índices Chao1, Shannon y Simpson) ↑ abundancia de taxones benéficos ↑ respuesta inmune | (Foysal <i>et al.</i> , 2020) |
| Rodaballo <i>Psetta maxima</i> Larvas | Inulina 2% 26 días | ↔ crecimiento ↔ supervivencia ↑ <i>Vibrio</i> | (Mahious <i>et al.</i> , 2006) |
| Beluga (<i>Huso huso</i>) Juveniles | Inulina 1, 2 y 3% 8 semanas | ↔ peso ↔ supervivencia ↓ recuento total de bacterias intestinales Relación negativa entre el % de inclusión y algunos parámetros de rendimiento (p.e TCE, aumento de peso, etc.) | (Akrami <i>et al.</i> , 2009) |

| | | | |
|--|---|--|--|
| <p>Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>) Alevines</p> | <p>Inulina 0.5 y 1% 7 semanas</p> | <p>↑ respuesta inmune ↔ crecimiento ↔ actividad de lipasa, proteasa y amilasa ↑ supervivencia ↑ lípidos corporales ↓ proteína corporal</p> | <p>(Eshaghzadeh <i>et al.</i>, 2015)</p> |
| <p>Lubina (<i>Lates calcarifer</i>) Alevines</p> | <p>Inulina 0.5, 1, 1.5 y 2% 60 días</p> | <p>↑ crecimiento ↔ lípidos corporales ↑ proteína corporal ↑ índice hepatosomático Posible efecto benéfico en la microbiota intestinal Dosis óptima: 1.5%</p> | <p>(Raffic Ali <i>et al.</i>, 2016)</p> |
| <p>Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)</p> | <p>Inulina 0.2, 0.4 y 0.8% 8 semanas</p> | <p>↑ crecimiento ↓ estrés oxidativo por hipersalinidad Aparente modulación de la microbiota intestinal Dosis óptima: 0.4%</p> | <p>(L. Zhou <i>et al.</i>, 2020)</p> |
| <p>Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)</p> | <p>Pared celular de <i>S. cerevisiae</i> 0.15 y 0.3% 60 días</p> | <p>↑ peso final, peso ganado, SGR y PER ↓ FCR ↑ proteína cruda y lípidos ↑ altura y densidad de las vellosidades intestinales ↑ células caliciformes y linfocitos intraepiteliales del intestino</p> | <p>(Selim & Reda, 2015)</p> |
| <p>Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)</p> | <p>Pared celular de <i>S. cerevisiae</i> 0.1 y 0.2% 60 días</p> | <p>↑ peso, SGR, PER y conversión alimenticia ↑ actividad fagocítica y de la lisozima ↑ resistencia a patógenos (<i>A. hydrophila</i> y <i>L. graviae</i>)</p> | <p>(Abu-Elala <i>et al.</i>, 2018)</p> |
| <p>Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)</p> | <p>B-glucanos aislados de pared celular de <i>S. cerevisiae</i> [0.0125%] Pared celular de <i>S. cerevisiae</i> (PC) [0.025%] 90 días (crecimiento) 4 semanas (microbiota intestinal)</p> | <p>↔ supervivencia ↑ (PC) peso y proteína cruda ↓ (PC) lípidos e índice vicosomático Aparente modulación de la microbiota intestinal</p> | <p>(Márquez-Martínez, 2020)</p> |
| | | | |

| | | | |
|---|--|---|--|
| <p>Camarón blanco del Pacífico (<i>Penaeus vannamei</i>) Juveniles</p> | <p>Pared celular de <i>S. cerevisiae</i> con enzimas fúngicas de <i>Trichoderma longibrachia</i> 0.5 y 1.0% 102 días</p> | <p>↑ Supervivencia ↑ peso final, ganancia de peso, SGR y rendimiento final ↓ FCR ↔ diversidad alfa ↑ abundancia relativa de <i>Bacillus</i></p> | <p>(Servin-Arce <i>et al.</i>, 2021)</p> |
| <p>Dorada (<i>Sparus aurata</i>)</p> | <p>Inulina [1%] <i>B. subtilis</i> [10^7 UFC g⁻¹] <i>B. subtilis</i> + inulina 4 semanas</p> | <p>↔ área de absorción intestinal Cambios negativos en la mucosa intestinal (signos de edema e inflamación) ↓ diversidad bacteriana</p> | <p>(Cerezuela <i>et al.</i>, 2013)</p> |
| <p>Surubí atigrado (<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>) Larvas (2 dpe)</p> | <p>(I) Inulina [1.16 g L⁻¹] (B) <i>B. subtilis</i> [1.16 g L⁻¹] (BI) <i>B. subtilis</i> + inulina Nauplios de artemia enriquecidos 12 días</p> | <p>↓ (BI) peso y SGR ↔ supervivencia ↓ (I) número de células calciformes ↓ (BI) área de absorción de nutrientes</p> | <p>(Oliveira <i>et al.</i>, 2020)</p> |

Los símbolos representan un aumento (↑), una disminución (↓) o ningún efecto (↔) en la respuesta especificada.

13.2 Extracción de ADN por método CTAB

- Limpiar el área de trabajo con alcohol al 96%.
- Colocar las muestras en tubos para precellys estériles de 2 mL, con 20-30 perlas de cerámica de 1.4 mm.
- Agregar 480 μ L de EDTA 0.5 M, homogenizar en precellys a 5000 rpm durante 20 s (5000 – 2x20 – 005).
- Añadir 120 μ L de lisozima (100 mg/mL), incubar a 37°C por 30 min, posteriormente centrifugar a temperatura ambiente por 2 min a 15,000 rpm. Retirar el sobrenadante.
- Adicionar 350 μ L de buffer CTAB y 20 μ L de proteinasa K [20 mg/mL]. Agitar brevemente.
- Colocar los tubos en un termoblock a 55°C hasta que el tejido esté lo suficientemente digerido (aprox. 20 minutos).
- Transferir el sobrenadante a tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL.
- Agregar 300 μ L de LiCl 5M, 5 μ L de RNAsa y agitar por un minuto; posteriormente añadir 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitar brevemente.
- Agitar la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min.
- Extraer 500 μ L de la capa acuosa (parte superior) del centrifugado y transferir a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL.
- Añadir 50 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 mL de Etanol 100% frío; agitar y colocar a -20°C por 1 hora aproximadamente.
- Centrifugar durante 20 min a 13,000 rpm a 4°C y retirar el sobrenadante cuidadosamente para no perder el ADN sedimentado.
- Agregar 750 μ 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 cuidando de no perder el pellet.
- Secar el pellet de ADN en una campana de flujo laminar, una vez seco, añadir 20 μ L (dependiendo del tamaño del pellet) de buffer TE para resuspender el pellet. Incubar a 55°C por 10 minutos.
- Almacenar a 4°C, -20°C o -80°C para uso continuo, mediano o largo plazo, respectivamente.

13.3 Índices de diversidad alfa

Resultados expresados en promedio \pm desviación estándar. Índices diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

| Tratamiento | Chao1 | Shannon |
|----------------|-------------------------------------|-----------------|
| R | 9537.24 \pm 1337.86 ^a | 4.37 \pm 0.62 |
| C | 8764.83 \pm 962 ^a | 4.92 \pm 0.74 |
| I | 5545.42 \pm 3439.35 ^a | 4.49 \pm 1.03 |
| W | 4754.63 \pm 3279.16 ^a | 4.52 \pm 1.77 |
| WI | 5574.82 \pm 2741.57 ^a | 5.57 \pm 1.26 |
| L | 3537.48 \pm 3471.18 ^a | 4.17 \pm 1.43 |
| LI | 2823.84 \pm 1884.32 ^{ab} | 2.86 \pm 1.10 |
| LW | 9760.19 \pm 1558.06 ^a | 5.29 \pm 1.12 |
| LWI | 5811.28 \pm 4337.43 ^a | 3.86 \pm 0.63 |
| p-valor | 0.005 | 0.132 |

Donde: R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* - pared celular, LWI= *L. acidophilus*-pared celular-inulina.

13.4 Phyla encontrados en mayor abundancia en la microbiota intestinal

Se enlistan los 15 phyla más abundantes, expresados en abundancia relativa promedio (%) ± desviación estándar.

| Phyla | Total | Tratamientos | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| | | R | C | I | W | WI | L | LI | LW | LWI |
| Proteobacteria | 45.10 ± 22.98 | 25.00 ± 2.98 | 26.20 ± 3.28 | 57.80 ± 21.8 | 58.50 ± 28.00 | 51.60 ± 10.20 | 64.40 ± 22.90 | 75.90 ± 30.80 | 36.50 ± 5.09 | 27.60 ± 9.14 |
| Planctomycetota | 14.92 ± 15.14 | 14.90 ± 5.43 | 12.90 ± 5.22 | 6.83 ± 5.22 | 14.20 ± 17.30 | 12.40 ± 11.60 | 17.60 ± 12.60 | 7.75 ± 10.20 | 4.82 ± 1.73 | 41.00 ± 24.40 |
| Chloroflexi | 11.94 ± 7.20 | 16.90 ± 2.87 | 19.20 ± 2.46 | 8.70 ± 8.76 | 6.44 ± 6.74 | 10.50 ± 2.26 | 4.31 ± 3.38 | 2.65 ± 3.95 | 19.70 ± 2.69 | 13.10 ± 3.01 |
| Acidobacteriota | 7.56 ± 4.82 | 10.70 ± 2.04 | 12.10 ± 2.97 | 6.17 ± 5.55 | 5.29 ± 3.36 | 4.30 ± 2.37 | 3.43 ± 3.37 | 2.90 ± 4.47 | 12.40 ± 1.43 | 7.17 ± 5.70 |
| Firmicutes | 5.84 ± 4.12 | 10.7 ± 2.23 | 11.90 ± 1.82 | 4.46 ± 3.75 | 3.02 ± 2.98 | 4.06 ± 1.08 | 2.65 ± 0.91 | 1.57 ± 2.13 | 7.84 ± 1.02 | 3.38 ± 2.40 |
| Actinobacteriota | 3.50 ± 3.73 | 2.09 ± 0.36 | 2.36 ± 0.44 | 5.89 ± 6.66 | 4.56 ± 5.84 | 6.10 ± 2.75 | 2.58 ± 2.89 | 4.95 ± 7.23 | 2.22 ± 0.15 | 1.77 ± 1.30 |
| Sumerlaeota | 2.88 ± 2.57 | 5.19 ± 1.42 | 4.56 ± 0.62 | 1.79 ± 2.20 | 1.95 ± 2.83 | 2.36 ± 1.99 | 0.31 ± 0.51 | 0.05 ± 0.09 | 6.17 ± 1.14 | 1.78 ± 2.75 |
| Cyanobacteria | 2.22 ± 2.20 | 4.08 ± 4.92 | 1.60 ± 0.74 | 2.71 ± 2.34 | 2.30 ± 1.98 | 3.49 ± 2.49 | 1.68 ± 0.82 | 1.40 ± 0.69 | 2.20 ± 0.49 | 0.49 ± 0.47 |
| Desulfobacterota | 1.37 ± 1.12 | 2.55 ± 0.37 | 2.12 ± 0.99 | 1.25 ± 1.20 | 0.80 ± 1.13 | 1.15 ± 0.57 | 0.15 ± 0.15 | 0.16 ± 0.22 | 2.61 ± 0.50 | 0.76 ± 1.32 |
| Bacteroidota | 0.85 ± 0.83 | 0.97 ± 0.92 | 0.34 ± 0.31 | 1.01 ± 1.05 | 0.33 ± 0.36 | 1.31 ± 1.15 | 1.68 ± 1.10 | 1.37 ± 1.12 | 0.34 ± 0.12 | 0.61 ± 0.52 |
| Fibrobacterota | 0.61 ± 0.56 | 0.99 ± 0.34 | 1.19 ± 0.57 | 0.51 ± 0.51 | 0.40 ± 0.60 | 0.56 ± 0.41 | 0.05 ± 0.09 | 0.01 ± 0.01 | 1.12 ± 0.21 | 0.31 ± 0.56 |
| Myxococcota | 0.40 ± 0.40 | 0.73 ± 0.36 | 0.75 ± 0.58 | 0.40 ± 0.22 | 0.17 ± 0.19 | 0.22 ± 0.19 | 0.05 ± 0.09 | 0.06 ± 0.10 | 0.79 ± 0.35 | 0.21 ± 0.34 |
| Fusobacteriota | 0.39 ± 0.61 | 0.08 ± 0.10 | 0.14 ± 0.02 | 0.76 ± 1.22 | 0.65 ± 0.98 | 0.85 ± 0.83 | 0.36 ± 0.50 | 0.42 ± 0.48 | 0.18 ± 0.09 | 0.24 ± 0.36 |
| Gemmatimonadota | 0.39 ± 0.33 | 0.69 ± 0.30 | 0.60 ± 0.31 | 0.34 ± 0.17 | 0.23 ± 0.29 | 0.41 ± 0.03 | 0.04 ± 0.04 | 0.001 ± 0.002 | 0.79 ± 0.10 | 0.17 ± 0.32 |
| Verrucomicrobiota | 0.33 ± 0.48 | 1.02 ± 0.65 | 0.88 ± 0.55 | 0.25 ± 0.38 | 0.08 ± 0.14 | 0.03 ± 0.02 | 0.01 ± 0.02 | 0.03 ± 0.05 | 0.26 ± 0.10 | 0.11 ± 0.22 |

Donde: R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* - pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina.

13.5 Géneros encontrados en mayor abundancia en la microbiota intestinal

Se enlistan los 22 géneros dominantes, expresados en abundancia relativa promedio (%) \pm desviación estándar.

| Género | Total | Tratamientos | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | R | C | I | W | WI | L | LI | LW | LWI |
| <i>Providencia</i> | 16.00 \pm 25.38 | 0.73 \pm 1.09 | 0.65 \pm 1.07 | 26.40 \pm 23.70 | 33.60 \pm 45.1 | 2.10 \pm 1.52 | 24.9 \pm 28.80 | 55.80 \pm 35.90 | 5.70 \pm 7.54 | 7.24 \pm 9.30 |
| <i>Nitrosomonas</i> | 10.48 \pm 8.93 | 18.8 \pm 3.08 | 20.00 \pm 3.92 | 8.55 \pm 9.74 | 6.44 \pm 10.3 | 9.73 \pm 5.81 | 1.17 \pm 1.81 | 0.11 \pm 0.10 | 18.3 \pm 2.1 | 5.06 \pm 7.36 |
| <i>U_Xanthomonadacea</i> | 9.55 \pm 8.33 | 17.70 \pm 2.30 | 16.90 \pm 3.16 | 8.26 \pm 9.77 | 4.34 \pm 7.39 | 9.31 \pm 3.36 | 0.91 \pm 1.28 | 0.06 \pm 0.10 | 18.30 \pm 2.29 | 4.30 \pm 7.92 |
| <i>Pasteurella</i> | 6.73 \pm 18.97 | 0.91 \pm 0.67 | 0.72 \pm 0.17 | 0.70 \pm 0.91 | 4.75 \pm 7.83 | 0.88 \pm 1.06 | 4.19 \pm 5.89 | 1.05 \pm 1.33 | 0.25 \pm 0.09 | 43.10 \pm 40.10 |
| <i>Luteitalea</i> | 3.51 \pm 3.15 | 6.05 \pm 1.49 | 7.27 \pm 0.74 | 3.13 \pm 3.09 | 1.80 \pm 2.48 | 2.05 \pm 1.40 | 0.33 \pm 0.50 | 0.11 \pm 0.09 | 6.69 \pm 1.23 | 1.77 \pm 3.35 |
| <i>Brevundimonas</i> | 3.51 \pm 8.01 | 0.28 \pm 0.03 | 0.22 \pm 0.09 | 4.68 \pm 8.60 | 0.68 \pm 0.22 | 15.30 \pm 22.90 | 3.13 \pm 4.58 | 3.76 \pm 5.65 | 3.20 \pm 4.36 | 2.55 \pm 2.69 |
| <i>Sumeriaea</i> | 3.43 \pm 3.14 | 6.78 \pm 1.43 | 5.92 \pm 1.11 | 2.12 \pm 2.75 | 2.23 \pm 3.31 | 2.75 \pm 2.33 | 0.35 \pm 0.60 | 0.05 \pm 0.91 | 6.87 \pm 1.22 | 1.71 \pm 3.22 |
| <i>Cutibacterium</i> | 2.93 \pm 4.42 | 0.15 \pm 0.21 | 0.31 \pm 0.17 | 4.50 \pm 7.35 | 3.22 \pm 4.38 | 6.24 \pm 2.97 | 3.35 \pm 4.59 | 5.58 \pm 8.80 | 0.93 \pm 0.12 | 3.79 \pm 4.04 |
| <i>U_Xanthobacteraceae</i> | 2.64 \pm 4.79 | 0.22 \pm 0.44 | 2.71 \pm 4.60 | 3.03 \pm 3.53 | 3.39 \pm 3.39 | 8.47 \pm 13.80 | 4.46 \pm 3.29 | 2.39 \pm 2.24 | 0.78 \pm 0.62 | 0.34 \pm 0.50 |
| <i>U_Vicinamibacteraceae</i> | 2.59 \pm 2.21 | 5.04 \pm 1.06 | 4.69 \pm 0.76 | 2.21 \pm 2.11 | 1.59 \pm 2.09 | 1.85 \pm 1.09 | 0.35 \pm 0.49 | 0.09 \pm 0.09 | 4.49 \pm 0.92 | 1.35 \pm 2.46 |
| <i>Pseudomonas</i> | 2.36 \pm 2.24 | 0.98 \pm 0.47 | 1.08 \pm 0.18 | 1.53 \pm 0.97 | 2.54 \pm 2.73 | 2.18 \pm 1.65 | 5.59 \pm 3.40 | 5.89 \pm 3.40 | 1.62 \pm 0.30 | 1.52 \pm 2.27 |
| <i>Ruminococcus</i> | 2.34 \pm 3.09 | 5.37 \pm 2.41 | 7.64 \pm 4.63 | 1.14 \pm 1.26 | 0.47 \pm 0.36 | 0.59 \pm 0.36 | 1.28 \pm 1.15 | 0.11 \pm 0.14 | 1.91 \pm 0.64 | 0.81 \pm 0.90 |
| <i>Rheinheimera</i> | 1.99 \pm 4.25 | 0.04 \pm 0.08 | 0.28 \pm 0.30 | 2.35 \pm 2.64 | 8.36 \pm 12.20 | 1.05 \pm 1.24 | 3.88 \pm 3.93 | 2.81 \pm 3.21 | 0.41 \pm 0.28 | 0.76 \pm 1.01 |
| <i>Aquimixticola</i> | 1.94 \pm 9.24 | 0.00 \pm 0.00 | 0.12 \pm 0.15 | 1.32 \pm 2.48 | 0.44 \pm 0.74 | 0.52 \pm 0.89 | 17.50 \pm 30.20 | 0.09 \pm 0.09 | 0.17 \pm 0.23 | 0.02 \pm 0.04 |
| <i>SEEP-SRB1_Desulfosarcinaceae</i> | 1.14 \pm 0.98 | 2.16 \pm 0.54 | 1.52 \pm 0.58 | 0.99 \pm 1.09 | 0.78 \pm 1.15 | 1.27 \pm 0.46 | 0.11 \pm 0.20 | 0.01 \pm 0.02 | 2.16 \pm 0.53 | 0.64 \pm 1.00 |
| <i>Clostridium</i> | 1.14 \pm 1.04 | 2.58 \pm 0.27 | 1.84 \pm 0.75 | 1.12 \pm 1.26 | 0.48 \pm 0.71 | 0.91 \pm 1.12 | 0.23 \pm 0.16 | 0.01 \pm 0.02 | 1.77 \pm 0.47 | 0.56 \pm 0.81 |
| <i>Stenotrophomonas</i> | 0.88 \pm 1.47 | 0.29 \pm 0.42 | 0.25 \pm 0.13 | 1.50 \pm 2.82 | 0.19 \pm 0.23 | 1.59 \pm 1.21 | 1.19 \pm 1.86 | 1.42 \pm 2.28 | 0.68 \pm 1.14 | 1.01 \pm 1.81 |
| <i>Klebsiella</i> | 0.77 \pm 1.52 | 0.25 \pm 0.23 | 0.04 \pm 0.09 | 1.14 \pm 2.15 | 0.24 \pm 0.20 | 0.10 \pm 0.11 | 1.96 \pm 3.39 | 1.22 \pm 1.69 | 0.26 \pm 0.22 | 1.82 \pm 2.03 |
| <i>Possible_Fibrobacteraceae</i> | 0.73 \pm 0.67 | 1.31 \pm 0.42 | 1.46 \pm 0.57 | 0.60 \pm 0.60 | 0.45 \pm 0.69 | 0.64 \pm 0.51 | 0.06 \pm 0.10 | 0.01 \pm 0.01 | 1.25 \pm 0.20 | 0.37 \pm 0.64 |
| <i>Rhodobacter</i> | 0.70 \pm 1.57 | 0.07 \pm 0.15 | 0.09 \pm 0.07 | 0.69 \pm 0.87 | 2.74 \pm 4.72 | 1.09 \pm 1.76 | 1.30 \pm 1.33 | 0.67 \pm 0.36 | 0.36 \pm 0.30 | 0.05 \pm 0.11 |
| <i>Achromobacter</i> | 0.69 \pm 1.68 | 0.02 \pm 0.03 | 0.00 \pm 0.00 | 0.47 \pm 0.93 | 0.02 \pm 0.02 | 2.95 \pm 4.74 | 1.35 \pm 2.29 | 0.99 \pm 1.58 | 0.49 \pm 0.64 | 0.60 \pm 0.68 |
| <i>Vibrio</i> | 0.65 \pm 1.30 | 0.81 \pm 0.71 | 0.07 \pm 0.08 | 0.48 \pm 0.27 | 0.68 \pm 0.65 | 2.57 \pm 4.00 | 0.82 \pm 0.82 | 0.31 \pm 0.50 | 0.15 \pm 0.06 | 0.44 \pm 0.69 |

Donde: R= rotífero, C= control, I= inulina, W= pared celular, WI= pared celular - inulina, L= *L. acidophilus*, LI= *L. acidophilus* - inulina, LW= *L. acidophilus* - pared celular, LWI= *L. acidophilus* - pared celular - inulina

13.6 Géneros compartidos por todos los tratamientos de alimentación

Se identificaron 73 géneros en común que se enlistan alfabéticamente a continuación:

| | |
|--|---|
| <i>Acinetobacter</i> | <i>Pedomicrobium</i> |
| Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium- Rhizobium | <i>Photobacterium</i> |
| <i>Anaeromyxobacter</i> | <i>Phyllobacterium</i> |
| <i>Atopostipes</i> | Pinus_Mitochondria_Rickettsiales |
| <i>Bacillus</i> | Possible_Fibrobacteraceae |
| <i>Bradyrhizobium</i> | <i>Providencia</i> |
| <i>Brevundimonas</i> | <i>Pseudomonas</i> |
| <i>Caldicellulosiruptor</i> | <i>Rheinheimera</i> |
| <i>Calothrix</i> | <i>Rhodobacter</i> |
| Candidatus_Acholeplasmataceae | <i>Roseiflexus</i> |
| Candidatus_Cloacimonadaceae | <i>Ruminococcus</i> |
| Candidatus_Koribacteraceae | SEEP-SRB1_Desulfosarcinaceae |
| Candidatus_Obscuribacteraceae | <i>Shewanella</i> |
| Candidatus_Solibacteraceae | <i>Sphingomonas</i> |
| <i>Caproiciproducens</i> | <i>Sporosarcina</i> |
| <i>Cetobacterium</i> | <i>Staphylococcus</i> |
| <i>Christensenellaceae</i> | <i>Stenotrophomonas</i> |
| <i>Clostridium</i> | <i>Streptococcus</i> |
| <i>Comamonas</i> | <i>Streptomyces</i> |
| <i>Cutibacterium</i> | <i>Sulfurihydrogenibium</i> |
| <i>Desulfatiglans</i> | <i>Sumerlaea</i> |
| <i>Escherichia-Shigella</i> | <i>Thermobrachium</i> |
| <i>Halomonas</i> | <i>Thermocrinis</i> |
| <i>Heliimonas</i> | Uncultured_AKYG1722_Thermomicrobiales |
| <i>Hoeflea</i> | Uncultured_Beijerinckiaceae |
| <i>Hyphomonas</i> | Uncultured_Caldilineaceae |
| <i>Iron-reducing_Gracilibacter</i> | Uncultured_Diplorickettsiaceae |
| <i>Klebsiella</i> | Uncultured_Gemmatimonadaceae |
| <i>Lactobacillus</i> | Uncultured_JG30-KF-CM45_Thermomicrobiales |
| <i>Legionella</i> | Uncultured_Obscuribacteraceae |
| <i>Luteitalea</i> | Uncultured_Rhodobacteraceae |
| <i>Metagenome_uncultured_Zavarziniales</i> | Uncultured_Rhodospirillaceae |
| <i>Methylobacterium-Methylorubrum</i> | Uncultured_Steroidobacteraceae |
| <i>Mobilicoccus</i> | Uncultured_uncultured_Acidobacteriales |
| <i>Nitratireductor_Rhizobiaceae</i> | Uncultured_uncultured_Actinomarinales |
| <i>Nitrosomonas</i> | <i>Vibrio</i> |
| <i>Pasteurella</i> | |