



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**LABORATORIO NACIONAL DE NUTRIGENÓMICA Y
MICROBIÓMICA DIGESTIVA ANIMAL**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

***EFECTO DE PROBIÓTICOS Y
PREBIÓTICOS SOBRE EL DESEMPEÑO DE
LARVAS DE PEZ BLANCO (*Chirostoma estor*)
Y SU INFLUENCIA EN LA MICROBIOTA***

TESIS QUE PRESENTA:

M. C. EDUARDO MARTÍNEZ ANGELES

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. PAMELA NAVARRETE RAMÍREZ

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, Julio 2022





**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**LABORATORIO NACIONAL DE NUTRIGENÓMICA Y
MICROBIÓMICA DIGESTIVA ANIMAL**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

***EFECTO DE PROBIÓTICOS Y
PREBIÓTICOS SOBRE EL DESEMPEÑO DE
LARVAS DE PEZ BLANCO (*Chirostoma estor*)
Y SU INFLUENCIA EN LA MICROBIOTA***

TESIS QUE PRESENTA:

M. C. EDUARDO MARTÍNEZ ANGELES

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. PAMELA NAVARRETE RAMÍREZ

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, Julio 2022



DEDICATORIA

A mis padres: este logro es de ustedes papá y mamá. No existe una palabra en el diccionario que pueda ayudarme a expresar plenamente lo que siento en este momento cada vez que miro hacia atrás. Gracias por dedicar cada gota de esfuerzo y lágrima derramada, tratando de evitar que mis hermanos y yo sufrieramos lo mismo que a ustedes les tocó sufrir; pues sin sus desvelos de largas jornadas de trabajo arduo y su invaluable apoyo ninguno de nosotros (sus hijos) hubiésemos podido alcanzar nuestras metas y sueños, que hasta hoy parecían inalcanzables.

A mis hermanos Jessy y Jorge: por tantos momentos y las experiencias vividas buenas, malas y peores, que pese a las adversidades, diferencias y demás situaciones difíciles que pasamos juntos, pudimos eludir desde el amor y el respeto mutuo.

A mis seres queridos: que ya no están en éste plano pero moran en mi corazón y alma.. Los amo y, los tendré presentes hasta el día de mi muerte.

A mi familia: quienes siempre han estado apoyándome, alentándome, aconsejándome o simplemente disfrutando de una plática amena con muchas risas y buena vibra.

A mi novia Edith Castillo Quintana: eres mi mejor amiga y confidente, con quién he disfrutado todo lo bueno y padecido lo malo. A a tí, que pese a no tener la necesidad de estar y soportar esta terrible enfermedad que me tocó vivir, hasta el día de hoy sigues de pie y hombro a hombro luchando conmigo, siendo la mujer más inteligente, maravillosa y buena que he conocido en toda mi vida. Realmente no sé que hice para merecerte, pero te amo.

Y al espíritu creador del Universo que me permitió continuar con vida, en contra de todos los pronósticos médicos de oncólogos, radiólogos, neurocirujanos, etc. Quienes afirmaron en múltiples ocasiones que era cuestión de tiempo y se equivocaron. Gracias a ti, estoy infinitamente agradecido del simple hecho de estar vivo y permitirme seguir haciendo esto que tanto me apasiona.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis Dr. Carlos Antonio Martínez Palacios, mi más sincero agradecimiento por compartirme sus inagotables conocimientos y las experiencias vividas durante todos estos años. Muchas gracias por permitirme formar parte de su grupo de investigación en el Laboratorio de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA) y poder aportar mi granito de arena a tan noble causa. Agradezco de sobremanera la libertad de pensamiento, así como la oportunidad de expresar y desarrollar mis propias ideas, cuestionamientos, etc., y por el apoyo brindado durante mi desempeño como estudiante. Gracias por su amistad, me siento honrado por la gran oportunidad que tuve de ser formado por un profesor e investigador reconocido a nivel nacional e internacional, con una trayectoria profesional sobresaliente, tiene usted mi franca admiración y respeto.

A mi Co-directora la Dra. Pamela Navarrete Ramírez, tal vez decirte “gracias” parezca poco, después de todo lo que me has ayudado en el desarrollo de este proyecto; así como en la redacción y revisión de los artículos publicados y/o sometidos hasta el momento. Gracias por mostrarme tu empatía y gran corazón, pues desde que me diagnosticaron el cáncer, tú nos apoyaste a realizar los trámites de inscripción y hacerlos llegar a la coordinación del PIDCB para poder continuar con mi formación académica sin perder el servicio médico. En fin, no terminaría de agradecerte todo lo que hiciste para que yo tuviese la oportunidad de recuperar mi salud. Desde la humildad, mi más honesto y profundo agradecimiento Pame. Que el universo conspira a tu favor para que te brinde cosas buenas y obtengas lo que te mereces. Espero algún día, tener la oportunidad de hacer lo que hiciste por mí y, poder ayudar a alguien más que lo necesite. Eres una excelente persona e investigadora admirable.

Al Dr. Leonardo Ibarra Castro, mil gracias por aceptarme como su estudiante y abrirme las puertas de su laboratorio y de la planta piloto-comercial de producción de peces marinos, pues sé lo difícil que es siquiera ganarse el derecho de ingresar a la misma. Muchísimas gracias por compartirme sus valiosos conocimientos y permitirme formar parte de su equipo de trabajo en el CIAD, Mazatlán. Haciéndome sentir un miembro más del gran equipo que

lo rodea y, de quiénes también tuve la oportunidad de aprender mucho e influyeron en mi formación. Por esto y más, me siento privilegiado de haber tenido la oportunidad de cumplir el sueño de aprender a cultivar peces marinos con alguien como usted, a quién respeto y admiro muchísimo por ser experto y un referente ampliamente distinguido en la materia.

A la Dra. Luciana Raggi Hoyos, por haber aceptado formar parte de mi comité tutorial y compartirme parte de su conocimiento sobre “Microbiómica” y por su invitación al curso de “Bioinformática de datos ómicos: Transcriptómica”, impartido por la Dra. Leticia Vega Alvarado y la M. C. Verónica Jimenez Jacinto, ambas académicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). A quienes también hago extenso mi más sincero agradecimiento, pues sin su ayuda e invaluable conocimiento no hubiese podido llevar a cabo los análisis de la microbiota de las larvas de pez blanco para la culminación del presente proyecto de tesis.

Al Dr. Juan José Valdéz Alarcón, muchas gracias por su apoyo y sus excelentes aportaciones durante cada uno de los tutorales y el examen pre-doctoral, las cuales sin duda enriquecieron este trabajo. Le agradezco enormemente sus consejos, especialmente en los momentos difíciles. Las palabras que me dijo después del examen pre-doctoral me ayudaron bastante para no dejarme caer y volver a la batalla con más fuerza, siempre las tendré presentes. Admiro muchísimo su sencillez y calidez humana, aunado a la impecable carrera profesional que ha construido como profesor e investigador destacado nivel nacional e internacional.

A los profesores e investigadores, Dra. María Gisela Ríos Durán, Dr. Jorge Fonseca Madrigal y Dr. Carlos Cristian Martínez Chávez del Laboratorio de Biotecnología Acuícola y Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA) del IIAF-UMSNH, por contribuir de manera importante en mi formación académica, siempre estaré sumamente agradecido con ustedes por brindarme su amistad y apoyo incondicional.

Al Dr. Juan Manuel Martínez Brown, mil gracias por su amistad y por compartirme algunos de sus preciados conocimientos. Gracias por esas charlas tan amenas e intensas que tuvimos, por contagiarme, aún más, de esa pasión que usted tiene por la ciencia y la importancia de la aplicación rigurosa del método científico, por constantemente cuestionarme e impulsarme a intentar ser una mejor versión de mi mismo para tratar de hacer el mejor trabajo posible, sin obtener nada a cambio, eso para mi tiene un gran mérito y mi gratitud hacia usted es inmensa.

M. en Ing. Sibila Concha Santos, muchísimas gracias por compartir tus conocimientos desde que inicié mi formación en el laboratorio, pero sobretodo por tu apoyo y el de tu familia Sibi, no tengo como pagarles todo lo que hicieron por mí. Que Dios y el universo te protejan para que jamás tengas que volver a pasar por esta terrible enfermedad que con valentía y entereza lograste superar. Mi enorme gratitud y respeto para ti.

A los coordinadores del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas (PIDCB), la Dra. Esperanza Melendez Herrera, el Dr. José Herrera Camacho y el Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado, así como a la jefa del Departamento de Administración del Posgrado de Biología la Lic. Patricia Liliana Cerritos Barriga, por su inconmensurable apoyo durante todo este proceso. Gracias a ustedes hoy puedo ver cristalizado un sueño que por un momento parecía desvanecerse por cuestiones de salud y, con su ayuda pude seguir estudiando sin perder el servicio médico, lo cual les agradezco infinitamente.

A todos mis amigos y amigas. Existe un viejo adagio que dice: “aquel que ha encontrado un amigo fiel ha encontrado un verdadero tesoro”; y yo encontré un tesoro inmenso. Pues los verdaderos amigos se conocen en la adversidad y que mejor muestra de ello. Mil gracias por aún estar presentes y al pie del cañon en todo momento. Muchas gracias por las risas, los ánimos y toda la buena vibra. Especialmente a Arturo Tapia, Maiko Alcantar, Mónica Pérez, Noelia Valle, César Arias, César Mier, Lupita Alcantar y Esteban Pintor.

A mis amigos de la maestría y doctorado del CIAD, Mazatlán: Josué Israel López Cardiel, Luis Antonio Rendón Martínez, Jaime Navarro Flores, Ángel Rojo Cebreros, así como a los técnicos Edgardo Maciel Zazueta y el Huicho. A todos ustedes gracias por todos los buenos momentos que pasamos, las convivencias y sobretodo por sus consejos y enseñanzas en el manejo y/o reproducción de las diferentes especies producidas en la planta piloto comercial.

A los técnicos, amigos y excompañeros del Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA), mil gracias a todos ustedes (no terminaría de nombrarlos pues somos bastantes), pero me gustaría agradecer en especial a Maricruz Álvarez, Gilmar Souza, Mateo Amillano y los demás compañeros involucrados para llevar a cabo el experimento correspondiente al tercer capítulo de la presente tesis. Muchas gracias por intentar ser mis manos y mis ojos, sin su gran ayuda este trabajo estaría incompleto.

CONTENIDO DE LA TESIS

INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE TABLAS.....	v
I. RESUMEN GENERAL	1
II. SUMMARY.....	2
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
IV. HIPÓTESIS	7
V. OBJETIVOS.....	8
VI. RESULTADOS	9
CAPÍTULO I.....	9
1. Introduction.....	10
2. Materials and methods	10
3. Results.....	14
4. Discussion.....	16
5. Conclusions.....	21
6. References.....	21
CAPÍTULO II.....	24
1. Introduction	24
2. Materials and Methods.....	24
3. Results	24
4. Discussion.....	24
5. References	24
CAPÍTULO III	25
1. Introducción	25
2. Materiales y métodos	27
3. Resultados.....	33
4. Discusión.....	43
5. Conclusión	53

6. Referencias	54
VII. DISCUSIÓN GENERAL	85
VIII. CONCLUSIONES GENERALES	94

INDICE DE FIGURAS

Figure 1. Evidence of feed consumption: A) Gastrointestinal tract of *C. estor* larvae (2 dph) fed with *B. plicatilis*. B) Gastrointestinal tract of *C. estor* larvae (2 dph) fed with microdiets..... 15

Figure 2. Final dry weight (mg) and total length (mm) of larvae fed for 30 days with rotifers (*B. plicatilis*) and those weaning with commercial microdiet (Otohime A1®) at 0, 5 and 10 dph. **R:** Larvae fed with rotifers, **0 dph:** larvae weaned with the commercial microdiet at 0 days post-hatching, **5 dph:** larvae weaned at five days post-hatching and **10 dph:** larvae weaned at 10 post-hatching. Results are expressed as mean and Standard Deviation bars. Different superscripts indicate significant differences between feeding treatments..... 15

Figure 3. Survival of larvae (%) fed for 30 days with rotifers (*B. plicatilis*) and weaned with commercial microdiet (Otohime A1®) at 0, 5 and 10 dph. **R:** Larvae fed with rotifers. **0 dph:** larvae weaned on commercial microdiet at 0 days post-hatching. **5 dph:** larvae weaned 5 days post-hatching and **10 dph:** larvae weaned 10 days post-hatching. Results are expressed as mean and Standard Deviation bars. Different superscripts indicate significant differences between feeding treatments..... 16

Figure 4. Individual final dry weight (mg) and total length (mm) of larvae at the end of the experiment with the different feeding treatments. **T0:** Otohime A1®, **T1:** microdiet with 83 g soluble protein Kg⁻¹, **T2:** microdiet with 278 g soluble protein Kg⁻¹, **T3:** microdiet with 214 g soluble protein Kg⁻¹, **T4:** microdiet with 151 g soluble protein Kg⁻¹. Results are expressed as mean and Standard Deviation bars. Different superscripts indicate significant differences between treatments. 16

Figure 5. Survival of larvae submitted to the different feeding treatments. **T0:** Otohime A1®, **T1:** microdiet with 83 g soluble protein Kg⁻¹, **T2:** microdiet with 278 g soluble protein Kg⁻¹, **T3:** microdiet with 214 g soluble protein Kg⁻¹, **T4:** microdiet with 151 g soluble protein Kg⁻¹. Results are expressed as mean and Standard Deviation bars. Different indices indicate significant differences between feeding treatments..... 17

Figure 6. Photographs of the microdiets used in trial 2. **A:** T0 (Otohime A1®); **B:** T1 (83 g soluble protein Kg⁻¹ diet); **C:** T2 (278 g soluble protein Kg⁻¹ diet); **D:** T3 (214 g soluble protein Kg⁻¹ diet); **E:** T4 (151 g soluble protein Kg⁻¹ diet). Scale 500x..... 18

Figure 7. Particle size distribution of the microdiets used during trial 2. a: commercial microdiet Otohime A1® (T0); b: microdiet with 83 g soluble protein Kg⁻¹ (T1), c: microdiet with 278 g soluble protein Kg⁻¹ (T2), d: microdiet with 214 g soluble protein Kg⁻¹ (T3), e: microdiet with 151 g soluble protein Kg⁻¹ (T4)..... 19

Figure 8. Total count of viable bacteria (CFU g⁻¹) of *L. acidophilus* supplied in microdiet diluted in ultra-filtered marine water or distilled water. Different superscripts indicate significant differences between treatments.....24

Figura 9. Peso seco (mg) y longitud total individual (mm) de las larvas de pez blanco sometidas a diferentes tratamientos de alimentación. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos. **R:** Rotíferos; **MC:** Microdieta control; **PC:** Pared celular; **LA:** *Lactobacillus acidophilus*; **LA + PC:** *L. acidophilus* y pared celular.....34

Figura 10. Supervivencia de las larvas de *C. estor* sometidas a los diferentes tratamientos de alimentación. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos. **R:** Rotíferos; **MC:** Microdieta control; **PC:** Pared celular; **LA:** *Lactobacillus acidophilus*; **LA + PC:** *L. acidophilus* y pared celular.35

Figura 11. Índices de α -diversidad calculados en el software R (ver. 4.0.5). Letras indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación de larvas de pez blanco ($p < 0.05$).37

Figura 12. El gráfico NMDS muestra las diferencias de la comunidad microbiana entre los distintos tratamientos de alimentación de larvas. Las distancias entre la comunidad fueron determinadas mediante el índice de disimilitud de Bray-Curtis. Estrés= 0.002402.....38

Figura 13. Análisis de similitud (ANOSIM) de la microbiota de larvas de *C. estor* sometidas a distintos tratamientos de alimentación. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.....39

Figura 14. Curvas de rarefacción de las comunidades bacterianas muestreadas en el tracto intestinal de larvas de pez blanco (*C. estor*), sometidas a distintos tratamientos de alimentación. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.....40

Figura 15. Composición bacteriana al nivel taxonómico de phylum de la microbiota de larvas de *C. estor* sometidas a distintos tratamientos de alimentación. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.....41

Figura 16. Composición bacteriana al nivel taxonómico de género de la microbiota de larvas de *C. estor* sometidas a distintos tratamientos de alimentación. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.....42

Figura 17. Gráfico UpSet representando la presencia de géneros bacterianos (OTU's) en todos los tratamientos de alimentación de larvas de *C. estor*. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.....43

INDICE DE TABLAS

Table 1. Microdiet ingredients and proximal composition g Kg ⁻¹ (mean ± standard deviation) of the different microdiets used during trial 2 (n = 3). Different superscripts indicate significant differences across columns. The ratios of fibrous and soluble protein sources are presented as a percentage of the total protein. Microdiet proportions were provided from California squid and fresh grouper fillets as fibrous protein sources, and egg albumin, WPC80 and calcium caseinate as soluble protein sources.	11
Table 2. Microdiet ingredients and proximal composition g Kg ⁻¹ (mean ± standard deviation) of the different microdiets used during trial 3 (n = 3).....	12
Table 3. Probiotic supplementation in the experimental microdiets.....	13
Table 4. Floating time (min) of the microdiets used in trial 2. Values are expressed in mean ± standard deviation.....	14
Table 5. Growth performance and feed efficiency of pike silverside (<i>Chirostoma estor</i>) larvae fed rotifers and the different experimental microdiets in trial 3. Data are expressed as the mean ± standard deviation. Different superscripts indicate significant differences between columns.	19
Table 6. Ingredients and proximal composition g Kg ⁻¹ (mean ± standard deviation) of the experimental microdiets (n = 3)	24
Tabla 7. Composición proximal (valores promedio ± desviación estándar) de las diferentes microdietas utilizadas durante el experimento. MC: Microdieta control; PC: Pared celular; LA: <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; LA + PC: <i>L. acidophilus</i> y pared celular	28
Tabla 8. Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia de larvas de <i>C. estor</i> . R: Rotíferos; MC: Microdieta control; PC: Pared celular; LA: <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; LA + PC: <i>L. acidophilus</i> y pared celular. Los datos se expresan en promedio ± desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre columnas.	36

I. RESUMEN GENERAL

La larvicultura de peces está basada en el consumo de presas vivas cultivadas a un alto costo y normalmente con un perfil nutricional deficiente. Esto ha propiciado el desarrollo de microdietas adicionadas con prebióticos y probióticos capaces de reducir el uso de alimento vivo y promover el crecimiento y/o supervivencia de los peces o crustáceos cultivados. Sin embargo, mantener la viabilidad de las cepas probióticas en la dieta artificial es desafiante. Los resultados de la presente investigación mostraron que las larvas de *Chirostoma estor* pueden aceptar microdietas artificiales desde el momento de la eclosión, pero cuando son destetadas a los 10 días post-eclosión después de un periodo de co-alimentación de tres días con rotíferos, es posible lograr un desempeño similar a las larvas alimentadas exclusivamente con rotíferos. Lo anterior sugiere que las larvas de pez blanco se adaptan gradualmente a las características (morfología de partículas, tamaño, flotabilidad, proporción de proteínas solubles) de las microdietas ofrecidas, alcanzado un crecimiento incluso mayor que las larvas destetadas con microdieta comercial (Otohime®). Interesantemente, cuando dicha microdieta es suplementada con un consorcio de cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* y *L. plantarum* en una proporción de 0.5 / 0.5% (1.27×10^9 UFC g⁻¹), permite incrementar significativamente el desempeño de las larvas aún más que las alimentadas únicamente con rotíferos vivos. Los resultados de este estudio mostraron que *L. acidophilus* puede permanecer viable hasta por 6 meses a 4 °C manteniendo un recuento adecuado (UFC > 10⁹) cuando es suplementado en microdietas secadas por aspersión para la alimentación de larvas de peces. Finalmente, se observó un aumento significativo en la supervivencia de las larvas de pez blanco alimentadas con microdietas suplementadas con *L. acidophilus* en comparación con el resto de los tratamientos de alimentación (MC, PC, LA, LA + PC). Lo anterior, parece indicar que las microdietas podrían ser utilizadas a partir de 10 dpe como un sustituto parcial o total del alimento vivo de larvas de *C. estor*. En tanto que, la suplementación de probióticos y/o prebióticos de pared celular de levadura (*S. cerevisiae*) en las microdietas provocan cambios sustanciales en la microbiota de la especie. Aunque, es importante esclarecer si los cambios en la estructura y composición de la comunidad bacteriana podrían reflejar diferentes funciones en el tracto digestivo de las larvas.

Palabras clave: Microdieta, prebióticos, probióticos, microbiota, pez blanco.

II. SUMMARY

Fish larviculture depends of expensive live prey with a poor nutritional profile. This has led to the development of microdiets enriched with prebiotics and probiotics capable of reducing the use of live food and promoting the growth and / or survival of cultivated fish and crustaceans. However, maintaining the viability of probiotic strains in the diet is challenging. The results of this study showed that the *Chirostoma estor* larvae can accept artificial microdiets from the moment of hatching, but if they are weaned 10 days post-hatching after a co-feeding period of three days with rotifers, it is possible achieve a similar performance to larvae fed only with rotifers. This suggests that pike silverside larvae could gradually adapt to the characteristics (particle morphology, size, buoyancy, proportion of soluble and fibrous proteins) of microdiets, reaching an even higher growth than larvae weaned with commercial microdiet (Otohime[®]). While a consortium of probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus* and *L. plantarum* supplemented at a proportion of 0.5 / 0.5% (1.27×10^9 CFU g⁻¹) in the microdiet, allowed to a significantly increase the performance of larvae even if they are fed only with live rotifers. On the other hand, the results of this study showed that *L. acidophilus* can remain viable for up to 6 months at 4 °C maintaining an adequate count (CFU > 10⁹) when it is supplemented in spray-dried microdiets for feeding fish larvae. Finally, a significant increase in the survival of pike silverside larvae fed with microdiets supplemented with *L. acidophilus* was observed compared to the rest of the feeding treatments (MC, CW, LA, LA + CW). This seems to indicate that microdiets could be used from 10 dph as a partial or total substitute for the live food of *C. estor* larvae. Meanwhile, the supplementation of probiotics and / or prebiotics of the yeast cell wall (*S. cerevisiae*) in the microdiets cause substantial changes in the microbiota of larvae. Although, it is important to clarify whether the changes in the structure and composition of the bacterial community could reflect different functions in the digestive tract of the fish larvae.

Keywords: Microdiet, prebiotics, probiotics, microbiota, pike silverside.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción acuícola está basada principalmente (62.5%) en el cultivo de especies de peces dulceacuícolas, la cual es una de las principales fuentes de alimento, nutrición e ingresos de cientos de millones de personas en el mundo. Además, es uno de los sectores de producción de alimentos con mayor crecimiento y comercialización a nivel mundial, ya que más de la mitad de las exportaciones pesqueras están destinadas al consumo humano (FAO 2020). La intensificación y comercialización de la producción acuícola actual, han planteado una serie de retos, entre estos destacan, los brotes de enfermedades causadas por diferentes tipos de agentes (principalmente bacterianos), que impactan de manera sustancial en la producción de los organismos acuáticos (Olafsen 2001) y al mismo tiempo, limitan el desarrollo económico y social de muchos países (Subasinghe 2005, FAO 2018).

El pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*) es una especie de Atherinópsido, endémico de México, con gran importancia comercial y cultural que comparte muchas características biológicas y fisiológicas con especies de peces marinos debido a que tienen un ancestro común (Martínez-Palacios *et al.* 2008, 2020). Las poblaciones silvestres de esta especie se encuentran en peligro de extinción como resultado de la degradación de su hábitat, la sobrepesca y la introducción de especies exóticas (Martínez-Palacios *et al.* 2004, 2007, 2020), por lo que su acuicultura es una gran alternativa para conservar esta especie.

Como sucede en otras especies de peces, la etapa larvaria de *C. estor* se considera crítica debido a que durante la primera alimentación exógena de las larvas, ocurre la mayor mortalidad (Martínez-Palacios *et al.* 2008), representando así el principal cuello de botella para el cultivo y comercialización de esta y otras especies de peces (Lazo *et al.* 2000, Langdon 2003, Zambonino-Infante y Cahu 2007, Conceição *et al.* 2010, Rehberg-Haas *et al.* 2015). En esta etapa, una vez que las larvas agotan las reservas del saco vitelino, dependen exclusivamente del alimento exógeno para poder adquirir los nutrientes y energía necesarios para continuar su desarrollo (Yúfera y Darias 2007). *Chirostoma estor* presenta una estructura bucofaríngea propia de un pez zoopláctofago filtrador (Ross *et al.* 2006), por lo que la alimentación de las larvas depende totalmente de la ingesta de presas vivas (rotíferos y nauplios de *Artemia*) para poder alcanzar un desempeño adecuado (Yúfera y Darias 2007, Hamre *et al.* 2013, Skalli *et al.* 2014, Mata-Sotres *et al.* 2015, Hien *et al.* 2017). Por lo anterior, el “destete” o cambio de alimentación de

presas vivas por dietas balanceadas se sabía que no era posible antes de los 2 o 3 meses después de la eclosión (Martínez-Palacios *et al.* 2004). Además, cuando las larvas comenzaban la alimentación exógena con dietas artificiales, era necesario co-alimentar con alimento vivo para evitar una elevada mortalidad y bajo crecimiento (Martínez-Palacios *et al.* 2007).

La calidad del alimento vivo y su disponibilidad son desafíos importantes para la acuicultura de cualquier especie, debido a que representa más del 70% de los costos operativos requeridos para la producción de la mayoría de las especies de importancia acuícola (Callan *et al.* 2003, Muzinic *et al.* 2004). Además, el alimento vivo tiene la desventaja de presentar un perfil nutricional deficiente (Rønnestad *et al.* 2001, Takeuchi *et al.* 2003, Conceição *et al.* 2010; Radhakrishnan *et al.* 2020), y para su producción masiva se requiere de una gran inversión económica en infraestructura, energía y personal altamente capacitado, lo cual incrementa los costos de producción, sobre todo durante las primeras fases de desarrollo (Koven *et al.* 2001, Blair *et al.* 2003, Langdon 2003). Por lo tanto, la calidad del alimento y los métodos de alimentación deben ser analizados de manera crítica, esto con el propósito de incrementar el crecimiento y la eficiencia alimenticia de los organismos cultivados (Tuan *et al.* 2013). La suma de estos factores, ha intensificado las investigaciones para desarrollar alternativas económicas y sostenibles, como la fabricación de dietas microagregadas (secadas por aspersión), el uso de bioencapsulados y la suplementación con aditivos (como probióticos y prebióticos) en el alimento (Pedroza-Islas *et al.* 2004, Pintado *et al.* 2010, Wang 2011), que proporcionen los nutrientes necesarios para un óptimo crecimiento y supervivencia durante la fase larvaria (Andrade *et al.* 2012, Hauville *et al.* 2014, Alam *et al.* 2015).

Una de las grandes ventajas en la elaboración de microdietas para la alimentación de larvas de peces, es que permiten introducir eficientemente diversos tipos de nutrientes que comúnmente no están disponibles en el alimento vivo (Saleh *et al.* 2013). Sin embargo, al momento de elaborar estas dietas es necesario contar con ingredientes de alta calidad que mantengan un ambiente saludable en el agua, reduzcan el riesgo de enfermedades y permitan disminuir los costos que involucra la producción del alimento vivo (Kanazawa y Teshima 1988, Martínez-Palacios *et al.* 2008). Adicionalmente, son muchos los factores (tamaño de partícula, flotabilidad, textura, palatabilidad, etc.) que deben ser considerados al momento de formular una dieta artificial para que tenga rendimientos en el crecimiento y supervivencia larvaria similares o mejores que lo observado con las presas vivas (Rønnestad *et al.* 2001, García-Ortega

et al. 2003). Además, diversas investigaciones sostienen que la combinación de presas vivas con dietas formuladas para la alimentación de larvas de peces, puede estimular la aceptación de estas por los peces y con ello acortar el tiempo de alimentación con presas vivas (Curnow *et al.* 2006, Engrola *et al.* 2009, Jamali *et al.* 2018).

Por otro lado, se ha demostrado que todos los peces teleósteos cuentan con una microbiota o comunidad de microorganismos autóctona capaz de colonizar la superficie epitelial del intestino (Wong y Rawls 2012, Llewellyn *et al.* 2014, Li *et al.* 2015), la cual experimenta cambios ocasionados principalmente por la dieta (nivel trófico), pero también por otros factores como las condiciones ambientales, la edad, el estado nutricional del pez o su filogenia (Sullam *et al.* 2012, Nelson *et al.* 2013, Wu *et al.* 2013, Miyake *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016, Dehler *et al.* 2017, Tarnecki *et al.* 2017). La generación de conocimiento sobre la microbiota intestinal es fundamental para comprender su función en la salud de los peces, especialmente durante el estadio larvario, lo que a su vez tendrá implicaciones en la manipulación de las comunidades microbianas intestinales en peces de cultivo para el mejoramiento del desempeño general de estos (Giatsis *et al.* 2014, Ingerslev *et al.* 2014, Bakke *et al.* 2015, Ringø *et al.* 2018, Le *et al.* 2020). Todo lo anterior, ha aumentado el interés por manipular la composición de la microbiota de los peces mediante el uso de suplementos dietarios, como los prebióticos y probióticos, que permiten mejorar la salud de los organismos, ejercen un efecto positivo en el crecimiento, además propician un balance intestinal y resistencia contra enfermedades dentro del cultivo (Kesarcodi-Watson *et al.* 2008, Merrifield *et al.* 2010, Nayak 2010a, Hai 2015, Banerjee y Ray 2017, Tarnecki *et al.* 2019).

El uso de probióticos es una alternativa con gran potencial para mitigar las enfermedades en los peces de cultivo, por su habilidad de controlar la presencia de algunas bacterias patógenas presentes en los peces, a través de una gran variedad de mecanismos (Balcázar *et al.* 2006, Merrifield *et al.* 2010). La mayoría de los probióticos utilizados con éxito en la acuicultura corresponden a las bacterias ácido-lácticas (BAL), especialmente de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Carnobacterium* (Carnevali *et al.* 2017, Ringø *et al.* 2018, Dawood *et al.* 2019), debido a que tienen la capacidad de incrementar la actividad enzimática digestiva y antioxidante (Sáenz de Rodríguez *et al.* 2009, Tovar-Ramírez *et al.* 2010), también influyen en el desarrollo del sistema inmune (Dimitroglou *et al.* 2011), y tienen la habilidad de promover la resistencia contra enfermedades causadas por bacterias patógenas (Dawood *et al.* 2016). Sin embargo, la

viabilidad de las cepas probióticas podría ser afectada por distintos factores químicos, físicos o biológicos (Terpou *et al.* 2019), por lo que la encapsulación de probióticos en microdietas secadas por aspersión es una de las tecnologías que ofrece una mayor viabilidad de las cepas comúnmente utilizadas (Páez *et al.* 2012, Soukoulis *et al.* 2014). Mientras que los prebióticos son componentes dietarios o sustratos utilizados eficazmente por microorganismos específicos (ej. Probióticos) capaces de promover el crecimiento y estimular la respuesta inmunológica innata de los peces cultivados, limitando la proliferación de bacterias potencialmente patógenas al favorecer el equilibrio de la microbiota intestinal benéfica para el hospedero (Gibson *et al.* 2017, Guerreiro *et al.* 2018, Mohan *et al.* 2019).

De tal manera que, tanto los probióticos como los prebióticos presentan un gran potencial para ser probados en la alimentación de larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*), ya que su inclusión y viabilidad en la microdieta permitiría promover el crecimiento de los peces y reducir los efectos causados por el estrés, disminuyendo así la mortalidad presente durante las fases larvaria y juvenil.

La presente tesis se divide en tres capítulos: el primero: “Efectos de microdietas formuladas para el destete exitoso y el rendimiento de larvas de pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* (Jordan, 1879)”; el segundo: “Efecto del secado por aspersión, tiempo de almacenamiento y la salinidad del agua en la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* (La-14) en microdietas para larvas de peces”; y el tercero: “Efecto de probióticos y prebióticos sobre el desempeño de larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*) y su influencia en la microbiota”.

IV. HIPÓTESIS

Las larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*) pueden consumir dietas microagregadas formuladas con distintas concentraciones de fuentes de proteína soluble sin afectar el rendimiento de las larvas, a la vez que disminuyen el tiempo de alimentación con presas vivas de *Brachionus plicatilis*. Además, la suplementación con probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*) en microdietas para larvas de *C. estor* ejerce un efecto positivo en el crecimiento y la supervivencia de las larvas, modulando su microbiota intestinal.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes microdietas formuladas en el tiempo de destete y desempeño de larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*) así como el resultado de la adición de probióticos y/o prebióticos a las microdietas sobre el crecimiento, la supervivencia y los cambios en la microbiota de la especie.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si las larvas recién eclosionadas aceptan microdietas formuladas.
- Obtener el tiempo óptimo de destete después de un periodo de co-alimentación con alimento vivo y microdietas.
- Evaluar el efecto de microdietas formuladas con diferentes proporciones de proteínas solubles sobre el rendimiento larvario.
- Evaluar el efecto de la suplementación de microdietas con dos cepas probióticas distintas en el desempeño de las larvas de pez blanco.
- Evaluar el efecto del proceso de secado por aspersión, el tiempo de almacenamiento y la salinidad del agua sobre la viabilidad de cepas probióticas encapsuladas en microdietas para la alimentación de las larvas de peces.
- Evaluar el crecimiento y la supervivencia de las larvas de *C. estor* alimentadas con microdietas suplementadas con probióticos y prebióticos.
- Evaluar el efecto sobre el microbioma intestinal de las larvas de pez blanco de Pátzcuaro, alimentadas con microdietas adicionadas con probióticos y/o prebióticos.

VI. RESULTADOS

CAPÍTULO I

Animal Feed Science and Technology 288 (2022) 115288



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Animal Feed Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anifeedsci



Effects of formulated microdiets on weaning success and larval performance of pike silverside *Chirostoma estor* (Jordan, 1879)

Eduardo Martínez-Angeles^a, Edith Castillo-Quintana^a, Pamela Navarrete-Ramírez^b,
María Gisela Ríos-Durán^a, Carlos Cristian Martínez-Chavez^a, Luciana Raggi^b,
Ruth Pedroza-Islas^c, Miguel Angel Olvera-Novoa^d, Carlos Antonio Martínez-
Palacios^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales – Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico[†] ^b CONACyT - Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales – Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico

^c Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas - Universidad Iberoamericana, Santa Fe, Mexico ^d Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de IPN, Unidad Mérida (CINVESTAV), Yucatan, Mexico[†]

ARTICLE INFO

Keywords:
Microdiets
Co-feeding
Larval performance
Probiotics
Pike silverside
Weaning

ABSTRACT

High growth and survival of fish larvae are still milestones that many cultured species have to achieve. A primary limitation is the capacity of fish larvae to digest conventional microdiet ingredients in their short intestine agastric alimentary canals, making live feed indispensable and costly in most cases.

Therefore, *ad hoc* formulation of microdiets taking into account the specific characteristics of an early digestive system may improve larvae growth and survival. For these, three trials were performed in pike silverside larvae to evaluate the minimum weaning time after a co-feeding period with live feed and a commercial microdiet; the performance of larvae fed formulated microdiets with different proportions of soluble proteins, and the effect of the best performing microdiet supplemented with different levels of probiotics on larvae growth and survival. Larvae weaned at 10 dph after a three day-period of co-feeding with live rotifers achieved similar performance to larvae exclusively fed with live rotifers. In terms of soluble protein proportions, only larvae fed the microdiet T2 containing 278 g soluble protein Kg⁻¹ presented higher growth performance than a commercial microdiet (Otohime®). Finally, larvae fed the microdiet with 278 g soluble protein Kg⁻¹ diet supplemented with the consortium *L. acidophilus* and *L. plantarum* (0.5/0.5%; 1.27 × 10⁹ CFU g⁻¹) presented the best performance, showing high potential as a total substitute for live feed in pike silverside larvae since 10 dph.

Abbreviations: CFU, Colonies formation units; CVF, cumulative volume fraction; d, diameter; dph, days post-hatching; FCR, feed conversion ratio; FDW, final body dry weight; FI, individual feed intake; FTL, final total length; IDW, initial body dry weight; IDWG, individual dry weight gain; IWG, individual weight gain; LA, *Lactobacillus acidophilus*; LP, *Lactobacillus plantarum*; ND, Not determined; S, survival; sd, standard deviation; SGR, specific growth rate; T0, commercial microdiet Otohime A1®; T1, microdiet containing 83, g soluble protein Kg⁻¹; T2, microdiet with 278 g soluble protein Kg⁻¹; T3, microdiet containing 214 g soluble protein Kg⁻¹; T4, microdiet with 151 g soluble protein Kg⁻¹; WG, weight gain %.

1. Introduction

Early fish feeding is in part conditioned by the fact that fish larvae have short intestines and lack gastric (acid) digestion. The latter is compensated by high intracellular digestive activity of soluble proteins that are found in high proportions in live feed (Carvalho et al., 2004). Digestive maturation occurs approximately two weeks after hatch in gastric fish species, a period by which conventional diets can be offered. However, the initial larviculture period is still critical for the commercial culture of most fish species requiring the additional costs of live feed. The Mexican pike silverside (*Chirostoma estor*) has a short-intestine and is agastric during all its life span, thus becoming an advantageous biological model for early fish nutrition and larvae microdiet formulation studies.

The use of appropriate microdiets during early co-feeding can promote the readily acceptance of microdiets in preparing for weaning (Hamre et al., 2013; Kolkovski, 2013). One of the advantages of using formulated microdiets for feeding fish larvae is that they allow the efficient introduction of various types of nutrients and/or supplements such as prebiotics and probiotics (Yúfera et al., 2002; Saleh et al., 2013; Kazun and Kazun, 2019; Yin et al., 2021).

Probiotics have been widely used in aquaculture as a tool to promote growth and control diseases, as well as complementary or substitute of antimicrobial compounds (Newaj-Fyzul et al., 2007; Kumar et al., 2008; Harikrishnan et al., 2010; Hernandez et al., 2010; Das et al., 2013; Kazun and Kazun, 2019). Limited studies have been conducted administering probiotics on fish larvae most of them by bioencapsulation (Gatesoupe, 1994; Planas et al., 2006; Kazun and Kazun, 2019) and few included directly in formulated microdiets (Yin et al., 2021).

Pike silverside (*Chirostoma estor*) is a zooplanktophagous stomachless atherinopsid of regional importance in Mexico (Martínez-Palacios et al., 2007, 2008; Ross et al., 2006; Martínez-Palacios et al., 2019). Its nutraceutical value makes it an exceptional candidate species for aquaculture (Fonseca-Madriral et al., 2014; Martínez-Palacios et al., 2020).

Larvae nutrition in pike silverside currently depends on cultured live feed such as rotifers and *Artemia* nauplii, achieving weaning after 2 months post-hatching (Martínez-Palacios et al., 2004). Thus, the design of formulated microdiets based on the capacity of fish larvae to digest soluble proteins, which could include probiotic supplementation, could be of great advantage for developing successful feeding protocols in the early life of pike silverside.

Therefore, the aims of the study were to evaluate the minimum weaning time after a co-feeding period with live feed and a commercial microdiet; the performance of larvae fed formulated microdiets with different proportions of soluble proteins, and the effect of the best performing microdiet supplemented with different levels of probiotics on larvae growth and survival. The results aim at developing an *ad hoc* feeding protocol that may improve larvae performance in these and other species.

2. Materials and methods

Three trials were performed to evaluate the weaning period, the adequate soluble and fibrous dietary protein proportion in microdiets, and the effect of probiotic dietary supplementation in pike silverside larvae performance.

3. Fish larval rearing and sampling

Newly hatched pike silverside larvae were obtained from the Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiología Digestiva Animal (LANMDA), Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Mexico. For each trial, larvae were placed in a system, which consisted of 5-L PVC tanks with water recirculation, including a 50-L biological filter. Pike silverside larvae (100) were randomly distributed in each tank (20 larvae L⁻¹) with a continuous light photoperiod (24 L:0D) was maintained during the experiments (Martínez-Chavez et al., 2014). Larvae were fed with microdiets during the day (from 09:30 h up to 18:30) every 1:30 h, to apparent satiation, and during the night with automatic feeders (BOYU®) programmed to feed every 4 h (20:00 h, 24:00 h, 04:00 h, and 08:00 h). During the study period, all parameters of water quality in each tank of larvae were measured at 10:00 am, according to the methods described by Talpur et al. (2013). Temperature was monitored daily with a mercury thermometer and salinity with an ATAGO S/Mill-E refractometer (Tokyo, Japan). Dissolved oxygen and pH were measured daily with an oximeter (YSI 55/25, Yellow Springs Ohio, USA) and potentiometer (Fisher-Scientific Model Accumet®, Waltham, Massachusetts, USA). Ammonium and nitrite were determined by spectrophotometry every third day with the help of a YSI brand Photometer (model 9500, Yellow Springs, Ohio, USA). All measured water quality parameters were maintained in safe ranges in all experiments (Boyd, 2012).

At the beginning of the experiments, 40 newly hatched *C. estor* larvae from the initial batch were euthanized in ice-cold water, then rinsed with distilled water, and weighed individually on a microbalance (Mettler Toledo MC5, Manassquan, New Jersey, USA) after removing the excess of water with filter paper. Finally, larvae were dehydrated in a forced air oven at 60 °C for 12 h to obtain dry weight. At the end of the experiments, the same procedure was performed with all the experimental larvae remained.

All the experiments were carried out in accordance with [The European Parliament and The Council of the European Union, 2010/63/EU](#) for animal experiments and the guidelines for the accommodation and care of animal used for experimental and other scientific purposes ([The Commission of The European Communities, 2007/526/EC](#)).

4. Elaboration and characterization of microdiets

5. Elaboration of microdiets

For trial 1 a commercial microdiet (Otohime A1®; 520 g protein Kg⁻¹ and 210 g lipids Kg⁻¹) was used. All experimental microdiets for trials 2 and 3 were produced at Laboratorio de Biopolímeros e Ingeniería de Alimentos, del Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas de la Universidad Iberoamericana, Mexico. Microdiets were formulated to contain 520 g Kg⁻¹ protein and 220 g Kg⁻¹ lipids ([Tables 1 and 2](#)). All microdiets were prepared as micro-aggregates by spray drying (Niro Atomizer Model Minor, Copenhagen, Denmark) with an atomization pressure of 2.8 bars, an inlet temperature of 185 °C, an outlet temperature of 75 °C, and a feeding rate of 30 mL/min.

6. Morphology of the microdiets

The external structure and shape of each microdiet used in trial 2 were examined. Three samples of each microdiet were covered with graphite and metallic copper using a metals evaporator (JEOL). These samples were observed by a scanning electron microscope (JEOL JSM-6400, Tokyo, Japan scanning microscope). Characteristics of the microdiets were observed: shape, wall, and possible fractures ([Rosemberg et al., 1988](#)).

Samples (0.1 mg) were taken to analyze the particle size of each microdiet. These analyses were performed by triplicate using a Mastersizer 2000 Ver 5.60 particle size analyzer (Malvern Panalytical). Also, microdiet size distribution was obtained with a Malvern 2600 SBOD particles size analyzer (Malvern Instruments, Malvern, England), using a normal log model ([Masters, 1985](#)). An estimate of the mean diameter of 50% of the cumulative volume fraction (CVF) was obtained. The mean diameter (d50) and the arithmetic standard deviation (sd= 0.5 [d84-d16]) were calculated from the cumulative distribution curve.

7. Particle buoyancy (floating time) of microdiets

Buoyancy tests were carried out by triplicate for each micro-aggregate used in trial 2. These tests were performed in a 1-L graduated cylinder with tap water using 0.1 mg of each microdiet and measuring the time in which the particle remained on the surface at 25°C.

8. Proximal composition of ingredients and all microdiets

Proximate analyses of ingredients and all microdiets were performed using standard methods ([AOAC, 2000](#)). Moisture according to the procedure 934.01 by drying at 100 °C for 24 h in an oven (Fisher-Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); crude fat method 920.39 by ether extraction using a Foss Tecator (2050 Soxtec Avanti, Cobham, England) auto extraction unit; crude protein using the procedure 968.06 (N x 6.25) by the Dumas method ([Ebling, 1968](#)) using a nitrogen analyzer (Leco FP-528 St. Joseph, Michigan, USA) and crude ash method 942.05 by incineration at 600 °C in a muffle furnace (Fisher-Scientific, Massachusetts, USA). Samples were analyzed in triplicate.

Table 1

Dietary formulation g Kg⁻¹ and chemical composition (mean ± standard deviation) of the different microdiets used during trial 2. T0: Commercial Diet; T1: 83 g soluble protein Kg⁻¹; T2: 278 g soluble protein Kg⁻¹; T3: 213 g soluble protein Kg⁻¹; T4: 151 g soluble protein Kg⁻¹. Different superscripts indicate significant differences across columns.

		Experimental Diets				
		T0 *	T1	T2	T3	T4
Ingredients (g Kg⁻¹)	Protein					
Ingredients ^a		NA	660.4	673.8	669.4	664.9
Cod liver oil		NA	92.6	97.9	96.1	94.3
Canola oil		NA	90.7	90.7	90.7	90.7
Soy lecithin		NA	19.3	19.3	19.3	19.3
Corn starch		NA	50.2	31.4	37.7	43.9
Guar gum		NA	20.0	20.0	20.0	20.0
Mineral premix ^b		NA	15.0	15.0	15.0	15.0
Vitamin C ^c		NA	3.4	3.4	3.4	3.4
Choline chloride ^d		NA	3.0	3.0	3.0	3.0
Vitamin premix ^e		NA	15.0	15.0	15.0	15.0
Others ^f		NA	30.5	30.5	30.5	30.5
Chemical Composition (g Kg⁻¹) (n = 3)						
Crude Protein		522.7 ± 0.6	516.3 ± 1.6	535.2 ± 3.6	536.2 ± 6.7	536.6 ± 1.8

Crude Lipids Ash	212.0 ± 16.0	211.8 ± 8.1	191.3 ± 0.8	197.6 ± 1.9	193.3 ± 0.9
Moisture	103.3 ± 0.1 ^{ab}	103.1 ± 0.7 ^{ab}	96.6 ± 2 ^b	97.7 ± 2.2 ^b	105.9 ± 3.4 ^a
Gross Energy (MJ Kg ⁻¹) (n = 3)	42.2 ± 0.4 ^a	42.8 ± 1.2 ^a	32.4 ± 1.8 ^b	35.1 ± 2.6 ^{ab}	34.2 ± 4.1 ^{ab}
Soluble protein (g Kg ⁻¹) (n = 4)	23.3 ± 0.4 NA	23.4 ± 0.2	0.1	0.2	23.1 ± 0.1
		83.2 ± 5.5	278.1 ± 9.4	213.1 ± 6.3	150.8 ± 3.2

NA: No information available from the manufacturer.

*Chemical composition of the commercial microdiet was analyzed in LAMNDA, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. ^a Fresh California squid, fresh grouper fillets, dry krill (Tetra), egg albumin (Abaquim S.A.), Whey Protein Concentrate (WPC80; America ali - mentos), calcium caseinate (Habacuq S.A. de C.V.), wheat germ. ^b Mineral premix: macro elements and trace elements (DSM Nutritional products). ^c L-Ascorbyl-2-Poliphosphate (AsPP), Rovimix®Stay C®35 (DSM Nutritional products). ^d Choline Chloride (DSM Nutritional products). ^e Vitamin premix (DSM Nutritional products). ^f Butyl hydroxytoluene (BHT: antioxidant), Crystalline Taurine, Betaine, orozuz powder, apple extract.

Table 2

Dietary formulation g Kg⁻¹ and chemical composition (mean ± standard deviation) of the different microdiets used during trial 3. Control: Base microdiet; LA 0.1: Base microdiet supplemented with *Lactobacillus acidophilus* 0.1% (1.27 ×10⁸ CFU / g of diet); LA 0.5: Base microdiet supplemented with *L. acidophilus* 0.5% (6.35 ×10⁸ CFU / g of diet); LP 0.1: Base microdiet supplemented with *L. plantarum* 0.1% (1.27 ×10⁸ CFU / g of diet); LP 0.5: Base microdiet supplemented with *L. plantarum* 0.5% (6.35 ×10⁸ CFU / g of diet); AP 0.1/0.1: Base microdiet supplemented with *L. acidophilus* 0.1% and *L. plantarum* 0.1% (2.54 ×10⁸ CFU / g of diet); AP 0.5/0.5: Base microdiet supplemented with *L. acidophilus* 0.5% and *L. plantarum* 0.5% (1.27 ×10⁹ CFU / g of diet).

	Experimental Diets						
	CONTROL	LA 0.1	LA 0.5	LP 0.1	LP 0.5	AP 0.1/0.1	AP 0.5/0.5
Ingredients (g Kg⁻¹)							
Ingredients ^a	665.3	665.3	665.3	665.3	665.3	665.3	665.3
Cod liver oil	92.4	92.4	92.4	92.4	92.4	92.4	92.4
Canola oil	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7
Soy lecithin	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3
Corn starch	45.3	44.3	40.3	44.3	40.3	43.3	35.3
Guar gum	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Mineral premix ^b	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Vitamin C ^c	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
Choline chloride ^d	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Vitamin premix ^e	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Others ^f	30.5	30.5	30.5	30.5	30.5	30.5	30.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ^g	0.0	1.0	5.0	0.0	0.0	1.0	5.0
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^h	0.0	0.0	0.0	1.0	5.0	1.0	5.0
Chemical Composition (g Kg⁻¹) (n % 3)							
Crude Protein	534.0 ± 1.0	536.3 ± 1.4	549.2 ± 2.9	534.5 ± 0.8	525.0 ± 3.0	523.6 ± 1.2	534.4 ± 1.2
Crude Lipids	224.3 ± 2.6	226.8 ± 1.7	224.0 ± 2.6	234.5 ± 3.0	235.6 ± 1.9	235.0 ± 1.5	237.8 ± 1.8
Ash	58.0 ± 1.0	53.7 ± 0.4	54.1 ± 0.1	52.6 ± 0.3	55.7 ± 0.4	50.8 ± 0.1	57.3 ± 0.3
Moisture	28.0 ± 1.0	27.1 ± 0.2	31.4 ± 1.2	25.5 ± 1.3	21.4 ± 1.2	24.5 ± 1.2	24.5 ± 1.3
Gross Energy (MJ Kg ⁻¹) (n = 3)	24.5 ± 0.8	24.7 ± 0.2	24.5 ± 3.3	24.9 ± 0.7	24.81 ± 0.6	24.84 ± 0.9	24.9 ± 0.5

^a Fresh California squid, fresh grouper fillets, dry krill (Tetra), egg albumin (Abaquim S.A.), Whey Protein Concentrate (WPC80; America ali - mentos), calcium caseinate (Habacuq S.A. de C.V.), wheat germ. ^b Mineral premix: macro elements and trace elements (DSM Nutritional products). ^c L-Ascorbyl-2-Poliphosphate (AsPP), Rovimix®Stay C®35 (DSM Nutritional products). ^d Choline Chloride (DSM Nutritional products). ^e Vitamin premix (DSM Nutritional products). ^f Butyl hydroxytoluene (BHT: antioxidant), Crystalline Taurine, Betaine, orozuz powder, apple extract. ^g *Lactobacillus acidophilus* (La-14 FloraFIT, Dupont, M' exico)

^h *Lactobacillus plantarum* (ATCC14917, CDBB1115 Coleccion NaI. de Cepas Microbianas y cultivos celulares, CINVESTAV, México)

9. Probiotic supplementation in microdiets

For trial 3, the base microdiet was supplemented with six different probiotic concentrations of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* strains alone or in combination. *Lactobacillus* strains were cultured in Lactobacilli MRS Agar (Difco TM) at a temperature of 37 °C for 20 h in an incubator (Scientific Shaker Incubator CVP-100B, Massachusetts, USA). Optical density was evaluated to monitor bacterial growth; a 1 mL sample was taken from each culture media and was diluted in saline solution (1:3 ratio). For each sample, the optical density was read at 660 nm in a spectrophotometer (Milton Roy, Rochester, NY, USA). Subsequently, 0.1 mL of the dilution was placed inside a Neubauer chamber, for counting the bacterial number per milliliter (CFU mL⁻¹) for each probiotic strain using the following equation:

$$\text{CFU mL}^{-1} = (\text{counted bacteria}) / [(\text{counted area (mm}^2) \times \text{chamber depth (mm)}) \times \text{dilution}]$$

Afterward, different dilutions of each probiotic strain were added directly to the homogeneous liquid mixture corresponding to the different microdiets before spray drying as shown in Table 3.

Before diets preparation, a microdiet enriched with *L. acidophilus* (2.98 ×10⁹ CFU g⁻¹) was evaluated in order to determine the viability of the probiotics after the spray-drying process. This process did not substantially impact the viability of the probiotic since

Table 3

Probiotic supplementation in the experimental microdiets.

Treatment	Probiotic	Inclusion level (%)	CFU g ⁻¹ diet
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.1	1.27 × 10 ⁸
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus</i>	0.5	6.35 × 10 ⁸
3	<i>plantarum</i>	0.1	1.27 × 10 ⁸
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.5	6.35 × 10 ⁸
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i>	0.1/0.1	2.54 × 10 ⁸
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i>	0.5/0.5	1.27 × 10 ⁹

CFU: Colonies Formation Units

bacterial concentration 24 h after the elaboration of the microdiet was 2.88 × 10⁹ CFU g⁻¹, which represents about 95% of the initial concentration added to the diet.

10. Experimental design

11. Trial 1

To determine the appropriate weaning time for pike silverside larvae, a feeding trial was performed for 30 days. Four feeding treatments with five repetitions were established: **Treatment 1:** Larvae were fed only with a commercial microdiet (Otohime A1®) from day 0 until 30 days post-hatching (dph). **Treatment 2:** Larvae were fed with rotifers (*Brachionus plicatilis*) (25–30 rotifers m L⁻¹) from 0 to 3 dph, then from 3 to 5 dph were co-fed with rotifers and Otohime microdiet, and from 5 dph larvae were only fed with Otohime A1® up to the end of the trial. **Treatment 3:** Larvae were fed with rotifers from 0 to 6 dph; afterward, from 6 to 10 dph larvae were co-fed rotifers and Otohime A1®, and finally, from 10 dph, larvae were fed only Otohime up to 30 dph. **Treatment 4:** Larvae were fed only with rotifers through all the 30 experimental days (30 dph). Growth (dry weight and total length) and larval survival at the end of the 30 days were evaluated. As shown in Table 4, temperature was maintained at 23.00 ± 0.55°C and salinity at 7.30 ± 1.26 g L⁻¹ (Instant Ocean® sea salt).

12. Trial 2

To determine the adequate dietary proportion of soluble protein, a second feeding trial was carried out. Five feeding treatments with five repetitions were performed. In all cases, larvae were fed live rotifers from 0 dph to 7 dph. Also for all treatments, a co-feeding period (rotifer and their respective experimental microdiets) was performed from 7 to 10 dph. After this period, only their respective microdiet was offered daily to apparent satiation up to the end of the experiment (30 days). All experimental microdiets were formulated to have 520 g protein Kg⁻¹ and 220 g lipids Kg⁻¹ with different content of soluble protein, as follows: **Treatment 0:** Larvae were fed with the commercial microdiet Otohime A1® (T0). **Treatment 1:** Larvae were fed with a microdiet containing 83 g soluble protein Kg⁻¹ (T1). **Treatment 2:** Larvae fed microdiet with 278 g soluble protein Kg⁻¹ (T2). **Treatment 3:** Larvae were fed a microdiet with 214 g soluble protein Kg⁻¹ (T3). **Treatment 4:** Larvae fed experimental microdiet with 151 g soluble protein Kg⁻¹ (T4). The soluble protein content in the microdiets was determined by quadruplicate, by the method of Bradford (1976), using a microplate and an “Eliread” microplate reader (KONTROLab). Larvae growth (dry weight and final length) and survival were evaluated at the end of the experiment (30 dph). Water quality parameters are shown in Table 4.

13. Trial 3

To evaluate the effect of probiotic dietary supplementation of pike silverside larval performance, a third feeding trial was carried out. The T2 microdiet of the second trial was used as a base of all experimental microdiets. This base microdiet was supplemented with different proportions of *Lactobacillus acidophilus* (LA; La-14 FloraFIT, Dupont, M´exico) and/or *Lactobacillus plantarum* (LP; ATCC14917, CDBB1115 Coleccion Nal. de Cepas Microbianas y cultivos celulares, CINVESTAV, M´exico) to evaluate growth in terms of dry weight (mg), individual weight gain (IWG, mg day⁻¹), weight gain (WG, %), total length (mm), specific growth rate (SGR), and feeding efficiency in terms of Food Conversion Ratio (FCR) at the end of 30 days, as follows:

WG (%) = 100*(Individual final weight - Individual initial weight)/Individual initial weight; WG (mg) = Individual final weight (mg) - Individual initial weight (mg); IWG (mg day⁻¹) = WG (mg)/Time (days); SGR = (ln Individual final weight - ln Individual initial weight)*100/Time (days); Feed intake (mg day⁻¹) = [Feed intake per tank (mg)/number of fish]/Time (days); FCR = Feed intake (mg day⁻¹)/IWG (mg day⁻¹); S (%) = (final number of fish per tank *100)/initial number of fish per tank

The experiment consisted of eight treatments as follows: **Treatment 1:** the base microdiet containing 0.1% of LA. **Treatment 2:** base microdiet with 0.5% of LA. **Treatment 3:** base microdiet containing 0.1% of LP. **Treatment 4:** base microdiet supplemented with 0.5% of LP. **Treatment 5:** base microdiet with a combination of both probiotics (0.1% LA and 0.1% LP). **Treatment 6:** base microdiet with a combination of 0.5% LA and 0.5% LP. **Treatment 7:** Larvae were fed with base microdiet without probiotics as a control. **Treatment 8:** Larvae were fed *ad libitum* only with rotifers through all 30 days.

Feeding and co-feeding in all treatments were performed as in trial 2. Temperature was maintained at $22.05 \pm 0.25^\circ\text{C}$ and salinity at $7.14 \pm 0.37 \text{ gL}^{-1}$ (Table 4).

Table 4

Water quality parameters of larviculture systems in the different trials (n = 3).

Parameters	Trial 1	Trial 2	Trial 3
Temperature ($^\circ\text{C}$)	23.00 ± 0.55	22.00 ± 0.89	22.05 ± 0.25
Salinity (gL^{-1})	7.30 ± 1.26	7.03 ± 1.13	7.14 ± 0.37
pH	8.44 ± 0.15	8.53 ± 0.21	8.20 ± 0.11
Dissolved oxygen (mgL^{-1})	6.08 ± 0.48	5.74 ± 0.14	6.08 ± 0.13
Nitrite ($\text{mgL}^{-1}\text{NO}_2$)	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.01
Nitrate ($\text{mgL}^{-1}\text{NO}_3$)	3.46 ± 0.59	3.21 ± 0.97	3.31 ± 0.01
Ammonium ($\text{mgL}^{-1}\text{NH}_4$)	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.05	0.03 ± 0.01

2.4. *Data analysis* As the results obtained in the different experiments (proximal analyzes, growth performance, feeding efficiency, and survival parameters) complied with normality and homoscedasticity, they were analyzed by one-way ANOVA, with a significance level of $\alpha = 0.05$. A Tukey posthoc test was performed ($P = 0.05$), using SigmaPlot statistical software (ver. 13.0).

14. Results

15. Trial 1

Pike silverside larvae accepted and consumed, either the microdiet (Otohime A1®) or rotifer since 1 dph (Fig. 1 A and B). In terms of dry weight, there were no significant differences between larvae fed rotifers and larvae weaned at 5 and 10 dph (Fig. 2). The length and larval survival showed significant differences between the rotifer treatment and larvae weaned at days 0 and 5 after hatching (Figs. 2 and 3). However, no significant differences between the last two treatments were observed. Larvae weaned by 10 dph did not present significant differences in final length and survival compared to those fed exclusively with rotifers (Figs. 2 and 3).

16. Trial 2

The microdiets used in this trial were well accepted by larvae, consuming them voraciously. There were no significant differences in final dry weight between all experimental microdiets with the exception of T2 microdiet and Otohime A1® (Fig. 4). In terms of total length, there were no significant differences among all treatments (Fig. 4).

Larvae fed with the T2 microdiet (278 g soluble protein Kg^{-1} diet) had no significant differences in survival between larvae fed with T1 microdiet (83 g soluble protein Kg^{-1} diet) and Otohime A1® commercial microdiet. Meanwhile, larvae fed with the microdiets T3 and T4 presented significantly lower survival rates (Fig. 5).

17. Morphology and floating time of microdiets

The morphology of T2, T3 and T4 microdiets in trial 2, presented a typical morphology of spray drying nebulization, characterized by spherical external geometry of particles with dents. Some of the microspheres presented pores and few fractures. However, the morphology of these microdiets was entirely different from commercial microdiet Otohime A1® and T1 microdiet, where amorphous particles were observed (Fig. 6).

According to the results obtained by the particle analyzer (Mastersizer, 2000), 50% of particles in T2, T3, and T4 microdiets were below 21.02 μm , 18.84 μm and 27.64 μm , respectively. However, in T0 and T1 the 50% corresponded to particles below 61.95 μm and 80.28 μm , respectively (Fig. 7).

Table 5 shows the floating times of each microdiet used in trial 2.

18. Trial 3

The microdiets used in this trial were also well accepted by larvae. The results obtained in this trial showed that pike silverside larvae fed the microdiet supplemented with a combination of *L. acidophilus* and *L. plantarum* in high proportions 0.5/0.5% A/P ($1.27 \times 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$ each) presented the best growth performance of all treatments even better than those exclusively fed with live rotifer (Table 6). Survival was higher in larvae fed with rotifer, LA 0.5%, and LP 0.1% (Table 6). The best FCR was observed in larvae feed microdiets with LA (0.1% and 0.5%) and 0.5/0.5% A/P, in which the FI was similar. Also, FI was similar for larvae fed LP 0.1%, however, in this treatment, FCR was lower.

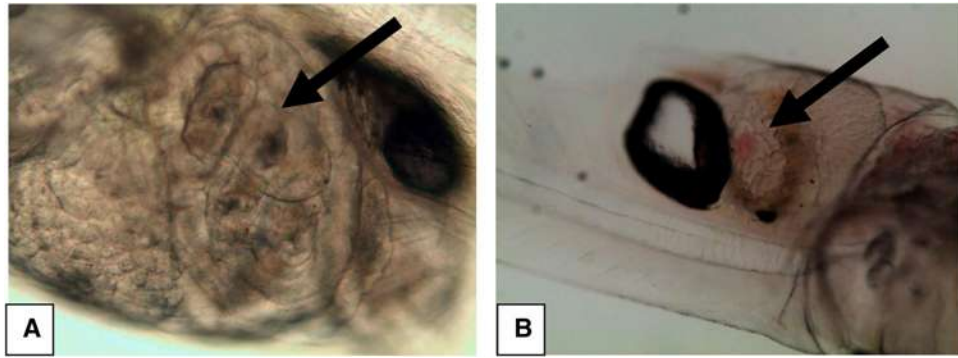


Fig. 1. Evidence of feed consumption: A) Gastrointestinal tract of *C. estor* larvae (2 dph) fed with *B. plicatilis*. B) Gastrointestinal tract of *C. estor* larvae (2 dph) fed with microdiets.

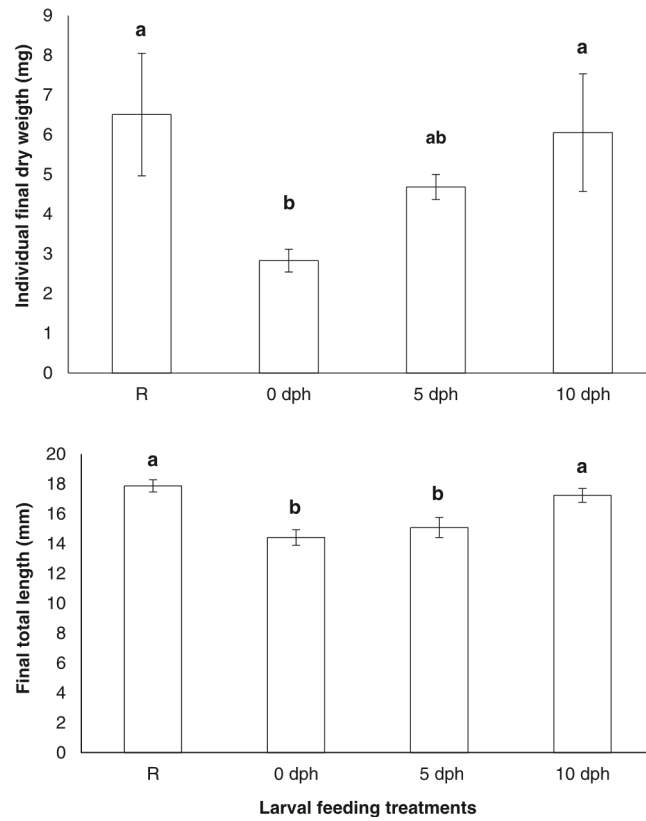


Fig. 2. Final dry weight (mg) and total length (mm) of larvae fed for 30 days with rotifers (*B. plicatilis*) and those weaning with commercial microdiet (Otohime A1®) at 0, 5 and 10 dph. R: Larvae fed with rotifers, 0 dph: larvae weaned with the commercial microdiet at 0 days post-hatching, 5 dph: larvae weaned at five days post-hatching and 10 dph: larvae weaned at 10 post-hatching. Results are expressed as mean and Standard Deviation bars. Different superscripts indicate significant differences between feeding treatments ($P < 0.05$).

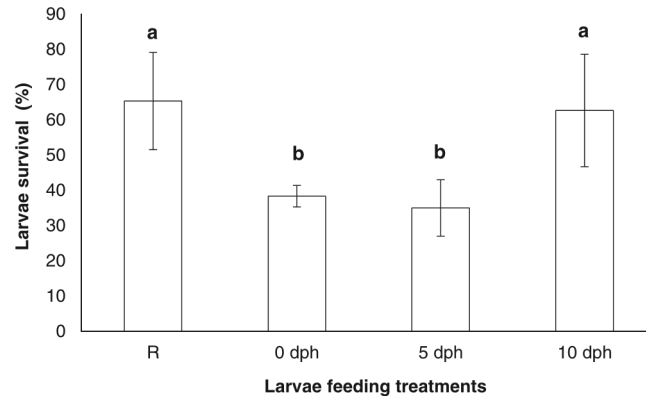


Fig. 3. Survival of larvae (%) fed for 30 days with rotifers (*B. plicatilis*) and weaned with commercial microdiet (Otohime A1®) at 0, 5 and 10 dph. R: Larvae fed with rotifers. 0 dph: larvae weaned on commercial microdiet at 0 days post-hatching. 5 dph: larvae weaned 5 days post-hatching and 10 dph: larvae weaned 10 days post-hatching. Results are expressed as mean and Standard Deviation bars. Different superscripts indicate significant differences between feeding treatments ($P < 0.05$).

19. Discussion

20. Trial 1

Replacing or reducing the use of live feed in fish larviculture with formulated microdiets has been one of the goals that could reduce

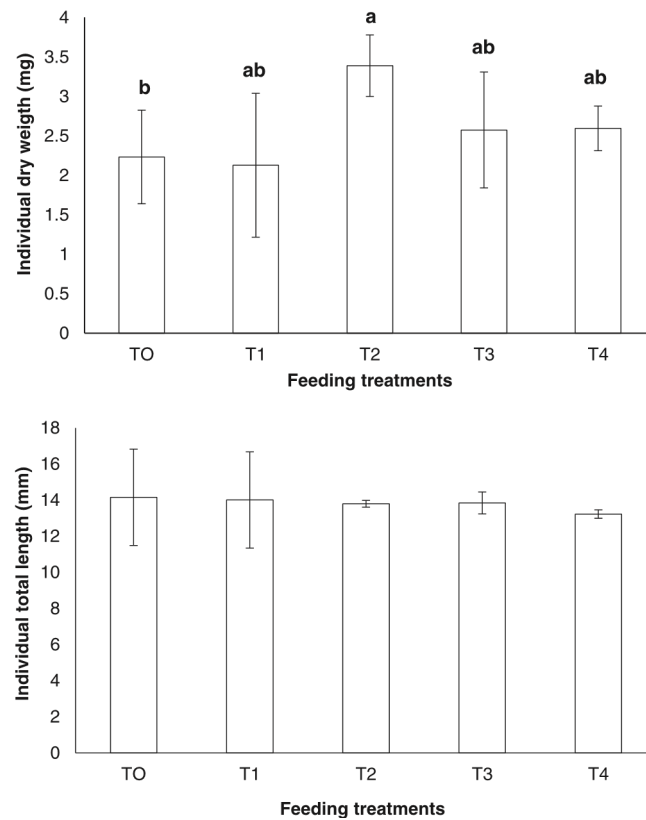


Fig. 4. Individual final dry weight (mg) and total length (mm) of larvae at the end of the experiment with the different feeding treatments. T0: commercial microdiet Otohime A1®, T1: microdiet with 83 g soluble protein Kg^{-1} , T2: microdiet with 278 g soluble protein Kg^{-1} , T3: microdiet with 214 g soluble protein Kg^{-1} , T4: microdiet with 151 g soluble protein Kg^{-1} . Results are expressed as mean and Standard Deviation bars. Different superscripts indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

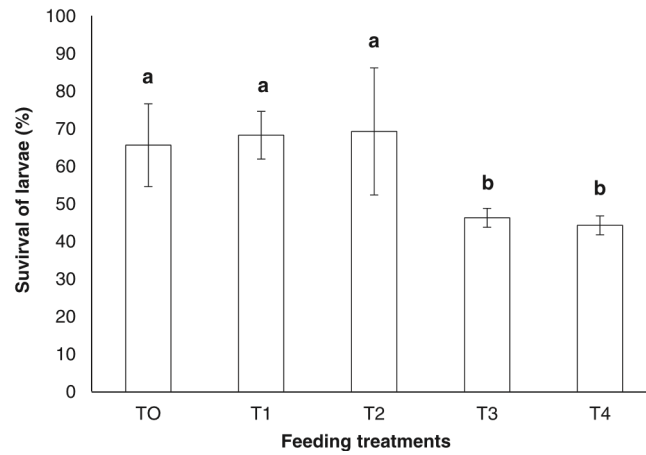


Fig. 5. Survival of larvae submitted to the different feeding treatments. T0: commercial microdiet Otohime A1®, T1: microdiet with 83 g soluble protein Kg⁻¹, T2: microdiet with 278 g soluble protein Kg⁻¹, T3: microdiet with 214 g soluble protein Kg⁻¹, T4: microdiet with 151 g soluble protein Kg⁻¹. Results are expressed as mean and Standard Deviation bars. Different indices indicate significant differences between feeding treatments (P < 0.05).

aquaculture production costs significantly (Zambonino-Infante and Cahu, 2007; Phelps, 2010). However, it is a challenge to formulate artificial diets comparable to live food in terms of nutritional value, digestibility, and utilization to maximize fish larvae performance (Hauville et al., 2014; Hansen et al., 2018).

Recent studies have shown that fish larvae can be successfully fed with artificial diets when used as partial substitutes (co-feeding)

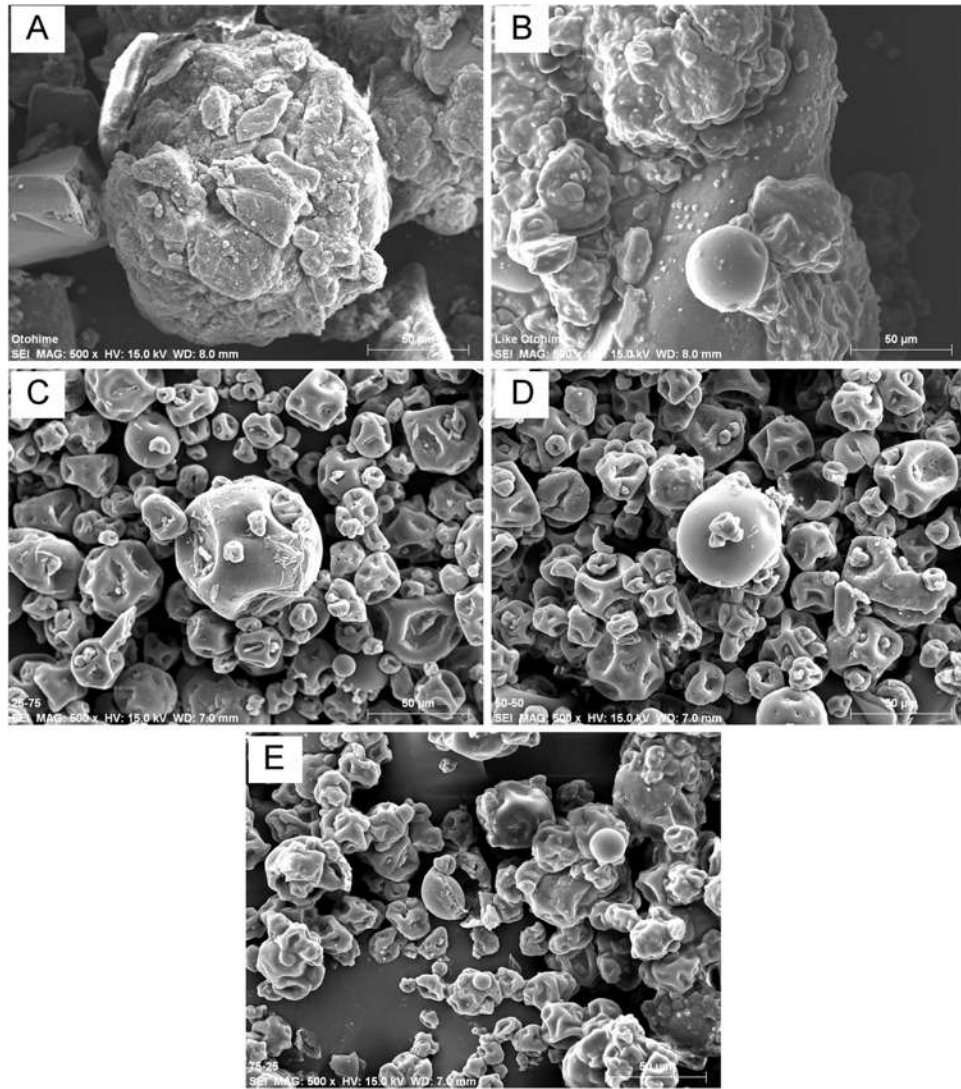


Fig. 6. Photographs of the microdiets used in trial 2. A: T0 (Otohime A1®); B: T1 (83 g soluble protein Kg⁻¹ diet); C: T2 (278 g soluble protein Kg⁻¹ diet); D: T3 (214 g soluble protein Kg⁻¹ diet); E: T4 (151 g soluble protein Kg⁻¹ diet). Scale 500x.

or as supplements of live feed (Hien et al., 2017). In fact, during the last five years, the period of weaning or transition to formulated diets in several fish larvae has been considerably reduced (Mata-Sotres et al., 2015; Hien et al., 2017). In this regard, several investigations support that a co-feeding period with live prey can successfully decrease the weaning period, allowing the larvae to gradually adapt to the physical and biochemical characteristics of the microdiet (Engrola et al., 2009; Herrera et al., 2010; Ma et al., 2014; Jamali et al., 2018).

According to Martínez-Palacios et al. (2004) *C. estor* larvae depend entirely on live prey during their first feeding until 2 or 3 months post-hatching, after which an artificial diet can be offered. However, at this point, co-feeding with live food is necessary to reduce high mortalities and poor growth. Notably, the results of the present study showed that *C. estor* larvae can be weaned by 10 dph using the Otohime A1® microdiet after a co-feeding period of three days between 7 and 10 dph. This weaning period agrees with a study in the Chinese long snout catfish *Leiocassis longirostris* weaned with commercial diets (Liu et al., 2012). On the other hand, it has been reported that larvae of meagre (*Argyrosomus regius*) can be weaned with commercial microdiets from 12 dph, but with significantly lower growth and survival results concerning the standardized feeding treatment for this species (Campoverde et al., 2017). Acceptable growth and survival were reported in marine larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata*) weaned from 8 dph (Yúfera et al., 2000).

Despite that several studies have tested formulated commercial microdiets to reduce the weaning period (Curnow et al., 2006; Muguet et al., 2011; Soligo et al., 2011; Woche et al., 2011; Policar et al., 2013; Palinska-Zarska et al., 2014; Hansen et al., 2018), very few have done it successfully, due in part to the lack of species-specific formulations.

Co-feeding with live food and formulated diets allow a progressive adaptation of the larvae to the physical and biochemical characteristics of microdiets (Curnow et al., 2006; Engrola et al., 2009; Mata-Sotres et al., 2015; Hien et al., 2017; Jamali et al., 2018),

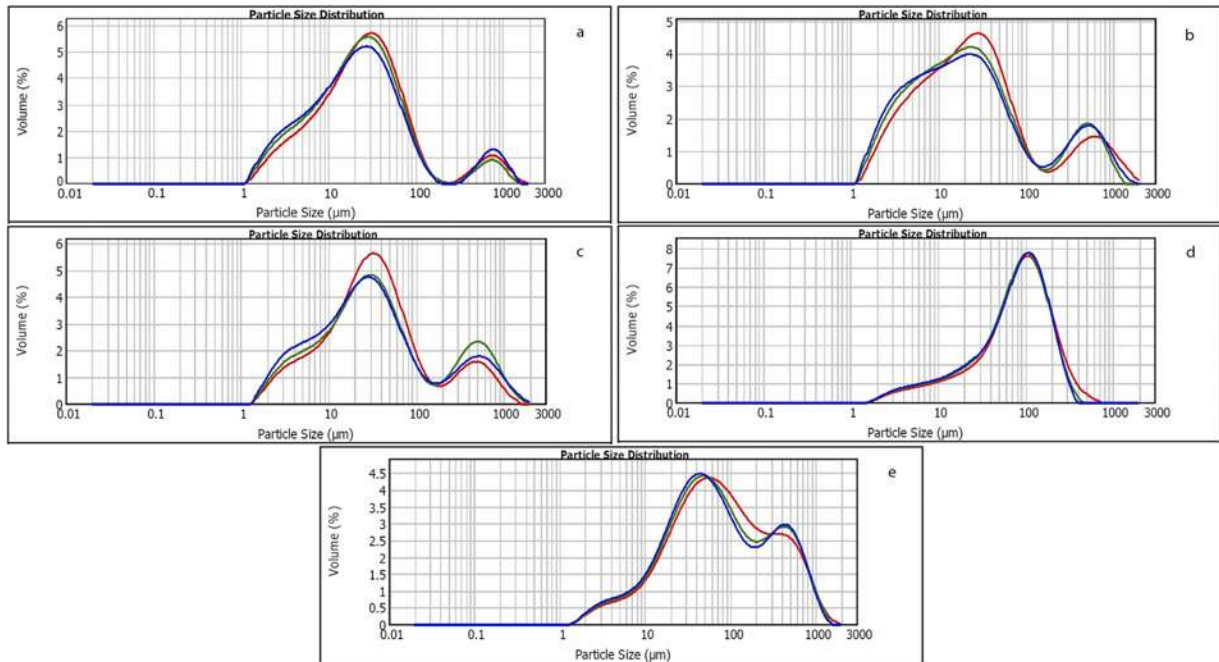


Fig. 7. Particle size distribution of the microdiets used during trial 2. a: commercial microdiet Otohime A1® (T0); b: microdiet with 83 g soluble protein Kg⁻¹ (T1), c: microdiet with 278 g soluble protein Kg⁻¹ (T2), d: microdiet with 214 g soluble protein Kg⁻¹ (T3), e: microdiet with 151 g soluble protein Kg⁻¹ (T4).

Table 5

Floating time (min) of the microdiets used in trial 2. Values are expressed in mean ± standard deviation.

Microdiet	Floating time (min)
T0	72 ± 0.831
T1	53 ± 0.743
T2	69 ± 0.551
T3	61 ± 0.004
T4	60 ± 0.056

T0: commercial microdiet Otohime A1®.

T1: microdiet with 83 g soluble protein Kg⁻¹.

T2: microdiet with 278 g soluble protein Kg⁻¹. **T3:** microdiet with 214 g soluble protein Kg⁻¹.

T4: microdiet with 151 g soluble protein Kg⁻¹.

providing an increase in larvae growth and a substantial decrease in the production costs of live food (Lazo et al., 2000; Callan et al., 2003). Thus, according to this and other studies, it is of great advantage to allow larvae to gradually adapt to the microdiets through a co-feeding period of at least 3–5 days before weaning (García-Ortega et al., 2003; Hauville et al., 2014; Mata-Sotres et al., 2015; Campoverde et al., 2017). Abrupt or inadequate weaning without a co-feeding period with live prey can cause stress, lower survival, a decrease in digestive enzyme activity, deterioration of some epithelial cells, and malnutrition of organisms (Engrola et al., 2007; Hamza et al., 2007; Trabelsi et al., 2011; Liu et al., 2012). In agreement with the latter, larvae in this study displayed a lower performance when fed exclusively with microdiet since 0 dph. These results suggest the necessity to develop *ad hoc* microdiets to assess whether live feed offering can be eliminated or if the co-feeding period can be reduced.

21. Trial 2

In this trial, the soluble protein content in microdiets significantly affects the growth and survival of pike silverside larvae. Larvae fed the different microdiets grew similarly regardless of soluble protein proportions; however, the microdiet T2 (278 g soluble protein Kg⁻¹ diet) presented the best growth performance than the commercial diet (T0). A previous report of microdiets containing considerable amounts of

soluble protein (120 g soluble protein Kg⁻¹ diet) has been shown to provide adequate growth performance in European seabass larvae (*Dicentrarchus labrax*) (Skalli et al., 2014). The lower weight found in *C. estor* larvae fed exclusively with the

Table 6

Growth performance and feed efficiency of pike silverside (*Chirostoma estor*) larvae fed rotifers and the different experimental microdiets in trial 3. Data are expressed as the mean ± standard deviation. Different superscripts indicate significant differences between columns (P < 0.05).

Feeding treatments								
Mean values	Rotifer	Control	LA 0.1	LA 0.5	LP 0.1	LP 0.5	AP 0.1/0.1	AP 0.5/0.5
IDW (mg)	0.10 ± 0.001	0.10 ± 0.001	0.10 ± 0.001	0.10 ± 0.001	0.10 ± 0.001	0.10 ± 0.001	0.10 ± 0.001	0.10 ± 0.001
FDW (mg)	2.72 ± 0.54 ^e	3.42 ± 0.36 ^{de}	4.63 ± 0.36 ^{bc}	5.16 ± 0.29 ^b	3.87 ± 0.21 ^e	4.59 ± 0.43 ^{bc}	4.23 ± 0.45 ^{cd}	6.43 ± 0.50 ^a
FI (mg day⁻¹)	ND	13.63 ± 0.76 ^a	11.91 ± 0.50 ^c	11.31 ± 0.38 ^c	11.39 ± 0.50 ^c	12.71 ± 0.72 ^{ab}	13.25 ± 0.49 ^{ab}	12.18 ± 0.54 ^{bc}
IWG (mg day⁻¹)	3.63 ± 0.1 ^e	3.51 ± 0.20 ^e	4.76 ± 0.08 ^{bc}	4.84 ± 0.13 ^b	3.68 ± 0.13 ^e	4.46 ± 0.08 ^c	4.05 ± 0.20 ^d	5.30 ± 0.24 ^a
IDWG (mg day⁻¹)	0.091 ± 0.02 ^e	0.11 ± 0.01 ^{de}	0.15 ± 0.01 ^{bc}	0.17 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.01 ^e	0.15 ± 0.01 ^{bc}	0.14 ± 0.01 ^{cd}	0.21 ± 0.02 ^a
WG (%)	2660 ± 524 ^e	± 361 ^{de}	4528 ± 355 ^{bc}	5031 ± 312 ^b	± 219 ^e	4447 ± 411 ^{bc}	4145 ± 468 ^{cd}	6275 ± 443 ^a
SGR (% day⁻¹)	10.87 ± 0.64 ^d	11.70 ± 0.38 ^c	12.7 ± 0.25 ^b	13.06 ± 0.21 ^b	11.65 ± 0.22 ^c	12.64 ± 0.3 ^b	12.40 ± 0.37 ^{bc}	13.79 ± 0.23 ^a
FTL (mm)	15.56 ± 0.54 ^d	16.06 ± 0.36 ^{cd}	17.75 ± 0.41 ^b	17.71 ± 0.30 ^b	17.18 ± 0.55 ^{bc}	16.87 ± 0.95 ^{bc}	17.11 ± 0.55 ^{bc}	20.12 ± 0.72 ^a
S (%)	88.2 ± 0.04 ^a	67.6 ± 0.05 ^d	80 ± 0.04 ^{bc}	84.4 ± 0.03 ^{ab}	83.6 ± 0.05 ^{ab}	73 ± 0.05 ^{cd}	69.6 ± 0.03 ^{cd}	77.4 ± 0.04 ^{bc}
FCR	ND	3.89 ± 0.26 ^a	2.50 ± 0.13 ^d	2.34 ± 0.13 ^d	3.09 ± 0.05 ^{bc}	2.84 ± 0.14 ^c	3.28 ± 0.17 ^b	2.30 ± 0.18 ^d

IDW: initial body dry weight, FDW: final body dry weight, FI: individual feed intake, IWG: individual weight gain, IDWG: individual dry weight gain, WG: weight gain %, SGR: specific growth rate, FTL: final total length, S: survival, FCR: feed conversion ratio, ND: Not determined.

Control: Base microdiet

LA 0.1: Base microdiet supplemented with *Lactobacillus acidophilus* 0.1% (1.27 × 10⁸ CFU / g of diet)

LA 0.5: Base microdiet supplemented with *L. acidophilus* 0.5% (6.35 × 10⁸ CFU / g of diet)

LP 0.1: Base microdiet supplemented with *L. plantarum* 0.1% (1.27 × 10⁸ CFU / g of diet)

LP 0.5: Base microdiet supplemented with *L. plantarum* 0.5% (6.35 × 10⁸ CFU / g of diet)

AP 0.1/0.1: Base microdiet supplemented with *L. acidophilus* 0.1% and *L. plantarum* 0.1% (2.54 × 10⁸ CFU / g of diet)

AP 0.5/0.5: Base microdiet supplemented with *L. acidophilus* 0.5% and *L. plantarum* 0.5% (1.27 × 10⁹ CFU / g of diet) commercial diet Otohime® coincides

with those in Florida pompano *Trachinotus carolinus*; larvae fed this microdiet (Hauville et al., 2014).

The performance obtained with the experimental microdiets could be explained by the natural habits of *C. estor* since zooplankton has high proportions of soluble proteins. These proteins can be more easily digested and absorbed by fish larvae (Carvalho et al., 2004) and thus readily introduced to the enterocytes by pinocytosis (Watanabe, 1981; Govoni et al., 1986). It has been reported that 67% of total protein in rotifers, at least 50.6% is soluble (Srivastava et al., 2006). Also, *C. estor* larvae appear to have a characteristic digestive enzyme profile, where the cytosolic enzyme activity is high (Toledo-Cuevas et al., 2011), winding up efficient soluble protein digestion. On the other hand, Tonheim et al. (2007) observed that water-soluble proteins are generally more digestible *in vitro* than water-insoluble proteins. This could be due to the ability of soluble proteins to absorb and adsorb water, making the microparticles softer and more digestible. In pike silverside, a high leucine alanine peptidase activity is maintained in juveniles and adults, which seems to be a compensation for the lack of a stomach and/or a long intestine (Martínez-Palacios et al., 2008; Toledo-Cuevas et al., 2011), similarly to what is found in other agastric fish (Lauff and Hofer, 1984; Cahu and Zambonino-Infante, 1994; Ma et al., 2014).

The external geometry of spherical particles with dents was observed in general. The formation of these dents is due, among other things, to the loss of water from the dehydrated drops during the first phases of the spray drying process (Rosemberg et al., 1988; Pedroza-Islas et al., 2004). However, the morphology of these diets is different from the commercial microdiet T0 and T1 microdiet, in which an amorphous structure was observed. The increase in the proportion of soluble protein could favor the formation of spherical structures because it may act as a surfactant agent that allows the production of those structures during spray drying.

One of the causes for the acceptance of microdiets in fish larvae is attributable to the size of microparticles (Fernandez-Díaz et al., 1994; Zambonino-Infante and Cahu, 2007). In this study, experimental microdiets presented a particle size range of 1–100 µm, with an average of 23 µm, compared to 1.6–363 µm and an average of 71 µm in T0 and T1. Moreover, experimental microdiets offered a greater number of smaller particles than those offered by microdiets T0 (Otohime A1®) or T1 (83 g soluble protein Kg⁻¹ diet) (Fig. 7). Both size and number of particles in relation to the jaw gape of *C. estor* larvae (Ross et al., 2006) may explain why larvae fed on experimental microdiets since 7 dph, performed better in this study. Nonetheless, T0 and T1 microdiets may be appropriate for larger larvae (>10 dph) since they have a similar particle diameter as adult rotifers (120–270 µm).

For fish larviculture, it is essential to guarantee that feed is readily available for larvae by staying on the surface as long as possible. In this study, most of the particles of the offered microdiets remained in the water column for more than 60 min, guaranteeing feed availability throughout the trial. Microdiet consumption was confirmed by its presence in the intestinal tract of *C. estor* larvae.

22. Trial 3

In this experiment, the best performance of pike silverside larvae was obtained with the microdiet 0.5/0.5 AP (1.27×10^9 CFU g^{-1}). These results are in agreement with those in Japanese sole (*Paralichthys olivaceus*), where *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* (7×10^{10} CFU g^{-1}) in consortium promoted better larvae growth when compared with feeds without probiotics or supplemented with *L. plantarum* individually (Beck et al., 2015). Other studies have also shown similar enhanced performances including feed conversion rates using different probiotic strains in consortia (Essa et al., 2010).

Despite that *L. acidophilus* and *L. plantarum* have been suggested to increase fish appetite (Lara-Flores and Olvera-Novoa, 2013; Yu et al., 2017; Zhai et al., 2017), in the present study, supplementation with these probiotics in high proportions (0.5/0.5) did not increase microdiet intake, moreover, it was lower than the control microdiet, indicating a better feeding efficiency. According to several authors, these probiotics could be positively modulating microbiota, which could provide additional nutritional sources through the synthesis of some amino acids, short-chain fatty acids, and vitamins, which could explain the better feed efficiency in the present study (Sugita et al., 1991; Molina et al., 2009; Leblanc et al., 2011; Rossi et al., 2011).

Besides, it is well known that probiotic strains can stimulate digestive enzyme activity and promote balance in the intestine (Dawood et al., 2015, 2016; Xia et al., 2018). Also, they can modulate the immune system, which in most cases translates into better growth and survival (Balcazar et al., 2006; Nayak, 2010). It is, therefore, necessary to perform further investigations in *C. estor* to describe the mechanisms and relationships of probiotics and gut microbiota.

The results of the present study highlight the importance of soluble proteins and the positive effects that probiotics could provide to fish larvae through microdiets, and in particular, the microdiet with 278 g soluble protein Kg^{-1} diet supplemented with *L. acidophilus* and *L. plantarum* in high proportions (0.5/0.5%), could be readily applied to replace live food during larviculture of pike silverside.

23. Conclusions

The present results showed that larvae weaned by 10 dph after a three day-period of co-feeding with live rotifers achieve similar performance to that of larvae exclusively fed live rotifers. Particle morphology, buoyancy, and size of all experimental microdiets allowed *C. estor* larvae to feed on them and achieved similar growth regardless of soluble protein proportions. Only larvae fed microdiet containing 278 g soluble protein Kg^{-1} presented higher growth performance than the commercial microdiet (Otohime®).

The results also showed that the microdiet with 278 g soluble protein Kg^{-1} supplemented with the consortium *L. acidophilus* and *L. plantarum* (0.5/0.5%; 1.27×10^9 CFU g^{-1}) presented the best performance, showing high potential as a total substitute for live feed in pike silverside larvae since 10 dph.

Conflict of interest

There is no conflict of interest declared in this article.

Data Availability

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article.

Acknowledgments

We thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT scholarships 305238, 591255, and Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal Project 268913) and Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH, Mexico for the financial support.

We also thank M. I. Sibila Concha Santos for technical support and Biol. Jesús López García for fish maintenance. **References**

AOAC, 2000. *Official Methods of Analysis of The Association Official Analytical Chemists*, seventeenth ed. E.U.A, Washington, DC, p. 1018.

Balcazar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuola, D., Cunningham D., Vendrell, Muzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114 (3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>.

Beck, B.R., Kim, D., Jeon, J., Lee, S.M., Kim, H.K., Kim, O.J., Lee, J.I., Suh, B.S., Do, H.K., Lee, K.H., Holzapfel, W.H., Hwang, J.Y., Kwon, M.G., Song, S.K., 2015. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish. Shellfish Immunol.* 42 (1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.035>.

Boyd, C., 2012. *Water Quality. Aquaculture*. 2nd ed. J.S. Lucas and P.C. Southgate. United Kingdom. 643 pp. <https://doi.org/10.1002/9781118687932.ch3>.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1–2), 248–254.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem Physiol. Part A Physiol.* 109 (2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90123-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90123-6).

Callan, C., Jordaan, A., Kling, L.J., 2003. Reducing *Artemia* use in the culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 219 (1–4), 585–595. <https://doi.org/>

- 10.1016/S0044-8486(03)00011-5.
- Campoverde, C., Rodríguez, C., Perez, J., Gisbert, E., 2017. Early weaning in meagre *Argyrosomus regius*: effects on growth, survival, digestion and skeletal deformities. *Aquac. Res.* 48 (10), 5289–5299. <https://doi.org/10.1111/are.13342>.
- Carvalho, A.P., Sa, R., Oliva-Teles, A., Bergot, P., 2004. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture* 234 (1–4), 319–333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.007>.
- Curnow, J., King, J., Bosmans, J., Kolkovski, S., 2006. The effect of reduced Artemia and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (BLOCH) larvae. *Aquaculture* 257 (1–4), 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.073>.
- Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S., Kamilya, D., 2013. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* [corrected] FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1547–1553. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.022>.
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., 2015. Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of Amberjack, *Seriola dumerili* juveniles. *Biomed. Res. Int.* 514196. <https://doi.org/10.1155/2015/514196>.
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., El-Sabagh, M., Esteban, M.A., Zaineldin, A.I., 2016. Probiotics as an environment-friendly approach to enhance red sea bream, *Pagrus major* growth, immune response and oxidative status. *Fish. Shellfish Immunol.* 57, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.038>.
- Ebeling, M.E., 1968. The Dumas Method for Nitrogen in Feeds. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 15 (4), 766–770.
- Engrola, S., Conceição, L.E.C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., Dinis, M.T., 2007. Improving weaning strategies for *Senegalese sole*: effects of body weight and digestive capacity. *Aquac. Res.* 38 (7), 696–707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01701.x>.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceição, L.E., Gavaia, P.J., Ribeiro, L., Dinis, M.T., 2009. Co-feeding in *Senegalese sole* larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture* 288 (3–4), 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.010>.
- Essa, M.A., El-Serafy, S., El-Ezabi, S., Daboor, M.M., Esmael, S.M., Lall, S. P., N.A., 2010. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *JAAS* 5 (2), 143–162.
- Fernandez-Díaz, C., Pascual, E., Yúfera, M., 1994. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar. Biol.* 118, 323–328. <https://doi.org/10.1007/BF00349800>.
- Fonseca-Madrugal, J., Navarro, J.C., Hontoria, F., Tocher, D.R., Martínez-Palacios, C.A., Monroig, O., 2014. Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of D4 and D6D5 desaturases of *Chirostoma estor*. *J. Lipid Res.* 55 (7), 1408–1419. <https://doi.org/10.1194/jlr.M049791>.
- García-Ortega, A., Abdo, I., Hernandez, C., 2003. Weaning of bullseye puffer (*Sphaeroides annulatus*) from live food to microparticulate diets made with decapsulated cysts of *Artemia* and fishmeal. *Aquac. Int.* 11, 183–194. <https://doi.org/10.1023/A:1024100618838>.
- Gatesoupe, F.J., 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquat. Living Resour.* 7 (4), 277–282. <https://doi.org/10.1051/alr:1994030>.
- Govoni, J.J., Boehlert, G., Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes* 16, 59–77. <https://doi.org/10.1007/BF00005160>.
- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L.E.C., Izquierdo, M., 2013. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Rev. Aquac.* 5 (Suppl. 1), S26–S58 <https://doi.org/10.1111/j.1755131.2012.01086.x>.
- Hamza, N., Mhetli, M., Kestemont, P., 2007. Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish. Physiol. Biochem.* 33, 121–133. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-9123-4>.
- Hansen, Ø.J., Puvanendran, V., Jøstensen, J.P., Falk-Petersen, I.B., 2018. Early introduction of an inert diet and unenriched *Artemia* enhances growth and quality of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquac. Nutr.* 24 (1), 102–111. <https://doi.org/10.1111/anu.12538>.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2010. Potential use of probiotic- and triherbal extract-enriched diets to control *Aeromonas hydrophila* infection in carp. *Dis. Aquat. Organ.* 92, 41–49. <https://doi.org/10.3354/dao02240>.
- Hauville, M.R., Zambonino-Infante, J.L., Bell, G., Migaud, H., Main, K.L., 2014. Impacts of three different microdiets on Florida pompano, *Trachinotus carolinus*, weaning success, growth, fatty acid incorporation and enzyme activity. *Aquaculture* 422–423, 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.006>.
- Hernandez, L.H.H., Barrera, T.C., Mejía, J.C., Mejía, G., Del Carmen, M., Dosta, M., De Lara-Andrade, R., Sotres, J.A.M., 2010. Effects of the commercial probiotic *Lactobacillus casei* on the growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juveniles of the Porthole livebearer *Poeciliopsis gracilis* (Poeciliidae). *Aquac. Nutr.* 16 (4), 407–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00679.x>.
- Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Oliveira, C., Ferrer, J.F., Marquez, J.M., Rosano, M., Navas, J.I., 2010. Weaning of the wedge sole *Dicologlossa cuneata* (Moreau): influence of initial size on survival and growth. *Aquac. Int.* 18, 475–485. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9258-2>.
- Hien, T.T.T., Tam, B.M., Tu, T.L.C., Bengston, D.A., 2017. Weaning methods using formulated feeds for snakehead (*Channa striata* and *Channa micropeltes*) larvae. *Aquac. Res.* 48 (9), 4774–4782. <https://doi.org/10.1111/are.13298>.
- Jamali, H., Ahmadifard, N., Noori, F., Agh, N., Gisbert, E., 2018. Improving co-feeding strategies for Neotropical green terror cichlid (*Aequidens rivulatus*) larvae with lecithin-enriched *Artemia franciscana* nauplii: Effects on survival, growth performance and body composition. *Aquac. Res.* 49 (12), 3909–3918. <https://doi.org/10.1111/are.13861>.
- Kazun, B., Kazun, K., 2019. Using probiotics in freshwater larviculture. *Fish. Aquat. Sci.* 27, 130–135. <https://doi.org/10.2478/aopf-2019-0015>.
- Kolkovski, S., 2013. Microdiets as alternatives to live feeds for fish larvae in aquaculture: Improving the efficiency of feed particle utilization. In: Allan, G., Burnell, G. (Eds.), *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Number 242, Woodhead Publishing Limited, Philadelphia, PA, pp. 203–223, 645.
- Kumar, R., Mukherjee, S.C., Ranjan, R., Nayak, S.K., 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish. Shellfish Immunol.* 24 (2), 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.008>.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., 2013. The use of lactic acid bacteria isolated from intestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), as growth promoters in fish fed low protein diets. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 41 (3), 490–497. <https://www.redalyc.org/pdf/1750/175028146012>.
- Lauff, M., Hofer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37 (4), 335–346. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90298-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90298-9).
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, J.G., Faulk, C., Arnold, C.R., 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 188 (3–4), 339–351. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00339-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00339-2).
- Leblanc, J.G., Laino, J.E., del Valle, M.J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., Sesma, F., 2011. B-group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. *J. Appl. Microbiol.* 111 (6), 1297–1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>.
- Liu, B., Zhu, X., Lei, W., Yang, Y., Han, D., Jin, J., Xie, S., 2012. Effects of different weaning strategies on survival and growth in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther) larvae. *Aquaculture* 364–365, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.051>.
- Ma, Z., Qin, J.G., Hutchinson, W., Chen, B.N., Song, L., 2014. Responses of digestive enzymes and body lipids to weaning times in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) larvae. *Aquac. Res.* 45 (6), 973–982. <https://doi.org/10.1111/are.12039>.
- Martínez-Chavez, C.C., Tello-Ballinas, A., Fonseca-Madrugal, J., Ross, L.G., Martínez-Palacios, C.A., 2014. Photoperiodic growth enhancement in a tropical batch spawning atherinopsid, pike silverside *Chirostoma estor*. *J. Fish. Biol.* 85, 546–553. <https://doi.org/10.1111/jfb.12442>.
- Martínez-Palacios, C.A., Morte, J.C., Tello-Ballinas, J.A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G., 2004. The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture* 238 (1–4), 509–522. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.032>.
- Martínez-Palacios, C.A., Ambríz-Cervantes, L., Ríos-Duran, M.G., Jauncey, K.J., Ross, L.G., 2007. Dietary protein requirement of juvenile Mexican Silverside (*Chirostoma estor* Jordan 1879), a stomachless zooplanktophagous fish. *Aquac. Nutr.* 13 (4), 304–310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00479.x>.
- Martínez-Palacios, C.A., Ríos Duran, M.G., Fonseca-Madrugal, J., Toledo-Cuevas, M., Sotelo-López, A., Ross, L.G., 2008. Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880. *Aquac. Res.* 39 (7), 738–747. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01926.x>.

- Martínez-Palacios, C.A., Concha-Santos, S., Toledo-Cuevas, E.M., Ríos-Duran, M.G., Martínez-Chavez, 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). *Neotrop. Ichthyol.* 18 (2), e190089 <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2019-0089>.
- Martínez-Palacios, C.A., Aguilar-Valdez, M.C., Strüssmann, C.A., Ríos-Duran, M.G., Toledo-Cuevas, E.M., Navarrete-Ramírez, P., Fonseca-Madrugal, J., Martínez-Chavez, C.C., Ross, L.G., 2019. The orobranchial structures in four neotropical silversides (Teleostei: Atherinopsidae) related with feeding habits. *Zoomorphology* 138, 511–523. <https://doi.org/10.1007/s00435-019-00457-1>.
- Masters, K., 1985. *Spray Drying Handbook*, fourth ed. John Wiley and Sons, New York, USA, p. 696.
- Mata-Sotres, J.A., Lazo, J.P., Baron-Sevilla, B., 2015. Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture* 437, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.037>.
- Molina, V.C., M'edici, M., Taranto, M.P., de Valdez, G.F., 2009. *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 prevents side effects produced by a nutritional vitamin B deficiency. *J. Appl. Microbiol.* 106 (2), 467–473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04014.x>.
- Muguet, J.-B., Lazo, J.P., Conklin, D.E., Piedrahita, R.H., 2011. Evaluation of weaning performance of California halibut (*Paralichthys californicus*) larvae using growth, survival and digestive proteolytic activity. *Aquac. Nutr.* 17 (2), 483–486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00786.x>.
- Nayak, S.K., 2010. Probiotic and immunity: a fish perspective. *Fish. Shellfish Immunol.* 29 (1), 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsuhag, A., Brunt, J., Austin, B., 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol.* 103 (5), 1699–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03402.x>.
- Palinska-Zarska, K., Zarski, D., Krejszef, S., Nowosad, J., Bilas, M., Trejchel, K., Brylewski, A., Targonska, K., Kucharczyk, D., 2014. The effect of age, size and digestive tract development on burbot, *Lota lota* (L.), larvae weaning effectiveness. *Aquac. Nutr.* 20 (3), 281–290. <https://doi.org/10.1111/anu.12076>.
- Pedroza-Islas, R., Gallardo, P., Vernon-Carter, E.L., García-Galano, T., Rosas, C., Pascual, C., Gaxiola, G., 2004. Growth, survival, quality and digestive enzyme activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquac. Nutr.* 10 (3), 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00284.x>.
- Phelps, R.P., 2010. Recent advances in fish hatchery management. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 95–101. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300011>.
- Policar, T., Stejskal, V., Kristan, J., Podhorek, P., Svinger, V., Blaha, M., 2013. The effect of fish size and stocking density on the weaning success of pond-cultured pikeperch *Sander lucioperca* L. juveniles. *Aquac. Int.* 21, 869–882. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9563-z>.
- Rosemberg, M., Talmon, Y., Kopelman, I.J., 1988. The microstructure of spray-dried microcapsules. *Food Microstruct.* 7, 15–23. <https://digitalcommons.usu.edu/foodmicrostructure/>.
- Ross, L.G., Martínez-Palacios, C.A., Aguilar-Valdez, M., Del C., Beveridge, M.C.M., Chavez-Sanchez, M.C., 2006. Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. *J. Fish. Biol.* 68 (6), 1782–1794. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01061.x>.
- Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S., 2011. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 3 (1), 118–134. <https://doi.org/10.3390/nu3010118>.
- Saleh, R., Betancor, M.B., Roo, R., Hernandez-Cruz, C.M., Moyano, F.J., Izquierdo, M., 2013. Optimum soybean lecithin contents in microdiets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquac. Nutr.* 19 (4), 585–597. <https://doi.org/10.1111/anu.12009>.
- Skalli, A., Zambonino-Infante, J.L., Kotzamanis, Y., Fabregat, R., Gisbert, E., 2014. Peptide molecular weight distribution of soluble protein fraction affects growth performance and quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquac. Nutr.* 20 (2), 118–131. <https://doi.org/10.1111/anu.12058>.
- Soligo, T.A., Garcia, A.S., Cerqueira, V.R., 2011. Weaning of the common snook (*Centropomus undecimalis*) early juveniles reared in laboratory using commercial and experimental diets. *Bol. Inst. Pesca* 37 (4), 367–374.
- Srivastava, A., Hamre, K., Stoss, J., 2006. Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): with emphasis on the water-soluble fraction. *Aquaculture* 254 (1–4), 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.014>.
- Sugita, H., Matsou, N., Shibuya, K., Deguchi, Y., 1991. The vitamin B12 producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture* 92, 267–276. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90028-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90028-6).
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., Abdullah, M.D.D., Bolong, A.M.A., 2013. Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): Effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. *Aquaculture* 416–417, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.018>.
- The Commission of The European Communities, 2007. Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (notified under document number C(2007) 2525). 2007/526/EC. Official Journal of the European Union. OJ L 197, 30.7.2007, p. 1–89.
- The European Parliament and The Council of the European Union, 2010. Directive 2010/63/EU of The European Parliament and of The Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. OJ L 276, 20.10.2010, p. 33–79.
- Toledo-Cuevas, E.M., Lopez, Moyano, Ramirez, F.J., Strüssmann, D.T., Alvarez-Gonzalez, C.A., Martínez-Chavez, C.A., Martínez-Palacios, C.C., 2011. Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquac. Res.* 42 (6), 776–786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02853.x>.
- Tonheim, S.K., Nordgreen, A., Høgøy, I., Hamre, K., Rønnestad, I., 2007. In vitro digestibility of water-soluble and water-insoluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. *Aquaculture* 262 (2–4), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.030>.
- Trabelsi, A., Gardeur, J.-N., Teletchea, F., Fontaine, P., 2011. Effects of 12 factors on burbot *Lota lota* (L., 1758) weaning performances using fractional factorial design experiment. *Aquaculture* 316 (1–4), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.027>.
- Watanabe, Y., 1981. Intracellular digestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells in larvae or juveniles of some teleost. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48 (1), 37–42. <https://doi.org/10.2331/suisan.48.37>.
- Wocher, H., Harsanyi, A., Schwarz, F.J., 2011. Husbandry conditions in burbot (*Lota lota* L.): Impact of shelter availability and stocking density on growth and behavior. *Aquaculture* 315 (3–4), 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.051>.
- Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., Liu, L., Zhang, D., Zhu, H., Yi, M., 2018. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish. Shellfish Immunol.* 76, 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.020>.
- Yin, Z., Liu, Q., Liu, Y., Gao, S., He, Y., Yao, C., Huang, W., Gong, Y., Mai, K., Ai, Q., 2021. Early life intervention using probiotic *Clostridium butyricum* improves intestinal development, immune response, and gut microbiota in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae. *Front. Microbiol.* 12, 640767. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640767>.
- Yu, L., Zhai, Q., Zhu, J., Zhang, C., Li, T., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., Tian, J., Chen, W., 2017. Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation enhances growth performance and alleviates aluminum toxicity in tilapia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 143, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.023>.
- Yúfera, M., Fernandez-Díaz, C., Pascual, E., Sarasquete, C., Moyano, F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J., García-Gallego, M., Parra, G., 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquac. Nutr.* 6 (3), 143–152. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00110.x>.
- Yúfera, M., Kolkovski, S., Fernandez-Díaz, C., Dabrowski, K., 2002. Free amino acid leaching from a protein-walled microencapsulated diet for fish larvae. *Aquaculture* 214 (1–4), 273–287. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00902-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00902-4).
- Zambonino-Infante, J., Cahu, C.L., 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture* 268 (1–4), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.032>.
- Zhai, Q., Wang, H., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., 2017. Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation decreases tissue lead accumulation and alleviates lead toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.* 48 (9), 5094–5103. <https://doi.org/10.1111/are.13326>.

CAPÍTULO II

Aquaculture

Effect of spray drying, storage time and marine water on the viability of *Lactobacillus acidophilus* (La-14) in microdiets for fish larvae

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AQUACULTURE-D-21-02852
Article Type:	Short Communication
Section/Category:	Larval Nutrition
Keywords:	microdiet; <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; viability; fish larvae
Corresponding Author:	María Gisela Ríos-Durán, Sc.D. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán MEXICO
First Author:	Eduardo Martínez-Angeles, M.Sc.
Order of Authors:	Eduardo Martínez-Angeles, M.Sc. María Gisela Ríos-Durán, Sc.D. Pamela Navarrete-Ramírez, Sc.D. Carlos A. Martínez-Palacios, Ph.D.
Abstract:	<p>The dietary use of probiotics, such as <i>Lactobacillus acidophilus</i>, has shown positive growth and survival results in several freshwater and marine fish species. However, maintaining probiotic viability in dry feed has been a challenge. The process of spray-drying is currently used to generate microdiets and has the potential to encapsulate and protect probiotics since the obtained product has minimal chemical modification. Nevertheless, scarce information exists about the influence of the spray-drying process and microdiet handling conditions, such as storage conditions and the water salinity, on the viability of <i>L. acidophilus</i> included in microdiets for feeding aquatic organisms. In this study, the effect of the spray-drying process, storage time, and marine water on the viability of <i>Lactobacillus acidophilus</i> probiotic strain encapsulated in microdiets for feeding fish larvae was evaluated. The results suggest that spray-dried microdiets supplemented with <i>L. acidophilus</i> La-14 can be stored up to 6 months at 4 °C maintaining an adequate CFU count ($>10^9$) and can be used as a probiotic supplement in microdiets for marine and freshwater fish larvae. This raises the possibility of implementing new feeding strategies such as the use of enriched microdiets with probiotic strains capable of resisting salinity and long-term storage, which can have an important application for the aquafeed industry.</p>
Suggested Reviewers:	Luis Andre Sampaio, Dr. sampaio@mikrus.com.br Carlos Augusto Strussmann, Dr. carlos@kaiyodai.ac.jp Dominique Bureau dbureau@uoguelph.ca Gustavo Somoza somoza@intech.gov.ar
Opposed Reviewers:	

CAPÍTULO III

Efecto de probióticos y prebióticos en el desempeño de larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*) y su influencia en la microbiota

1. Introducción

La acuicultura es el sector de producción de alimentos agrícolas con mayor crecimiento a nivel mundial (Garlock *et al.* 2019), cuya producción mundial esta cimentada principalmente en especies dulceacuícolas, representado una gran fuente de ingresos para cientos de millones de personas en el mundo (FAO 2020). Sin embargo, la implementación de sistemas intensivos de cultivo, para cumplir con la demanda actual de productos acuícolas, ha propiciado un incremento de distintos brotes de enfermedades ocasionadas por diferentes tipos de agentes bacterianos en los organismos cultivados (Olafsen 2001), lo cual restringe el progreso económico y social de países en vías de desarrollo (Subasinghe 2005, FAO 2018).

Al igual que muchas especies de peces zooplanctófagos, el cultivo larvario de *C. estor* está basado fundamentalmente en el consumo de alimento vivo (rotíferos y nauplios de *Artemia*) como primer alimento para poder lograr un apropiado crecimiento y supervivencia de la especie (Martínez-Palacios *et al.* 2008). Sin embargo, el perfil nutricional deficiente de las presas vivas (Rønnestad *et al.* 2001, Takeuchi *et al.* 2003, Zambonino-Infante y Cahu 2010, Conceição *et al.* 2010, Radhakrishnan *et al.* 2020) y su producción masiva continúan siendo retos relevantes. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, el costo operativo necesario para la producción intensiva de larvas de especies de alto valor económico es mayor al 70% (Callan *et al.* 2003, Muzinic *et al.* 2004). Esto ha despertado el interés de la comunidad científica para desarrollar alternativas económicas y sostenibles, como el uso y/o elaboración de microdietas formuladas que reúnan los nutrientes necesarios para el óptimo crecimiento y supervivencia de las larvas (Pedroza-Islas *et al.* 2004, Hamre *et al.* 2013, Hauville *et al.* 2014, Hansen *et al.* 2018), y permitan disminuir al mínimo la etapa de alimentación con presas vivas (Yúfera *et al.* 2015, Martins *et al.* 2018; Martínez-Angeles *et al.* en revisión).

Una opción viable tanto para obtener un crecimiento óptimo de los peces como para la mitigación de las enfermedades comúnmente presentes en el cultivo, es la incorporación de suplementos alimenticios en la dieta como el uso de probióticos (Pintado *et al.* 2010, Dawood *et al.* 2019). Los probióticos son microorganismos cuyos productos metabólicos ejercen efectos

positivos en el crecimiento y la salud del hospedero (Michel *et al.* 2007, Nayak 2010a, Dawood *et al.* 2016, Carnevali *et al.* 2017, Ringø *et al.* 2018, Wang *et al.* 2019), promoviendo el balance de los microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal (Larsen *et al.* 2014), así como un aumento de la actividad enzimática y antioxidante (Sáenz de Rodrigáñez *et al.* 2009, Tovar-Ramírez *et al.* 2010, Dawood *et al.* 2015, Xia *et al.* 2018), e intervienen en el desarrollo del sistema inmune del organismo, fomentando resistencia contra enfermedades provocadas por bacterias patógenas (Son *et al.* 2009, Dawood *et al.* 2016). Por otro lado, los prebióticos son componentes dietarios o sustratos que estimulan selectivamente la proliferación y/o actividad de bacterias benéficas (BAL) para el hospedero (Gibson *et al.* 2017, Guerreiro *et al.* 2018), por lo tanto también son aditivos que presentan efectos positivos para los organismos en cultivo.

Es ampliamente aceptado que todos los peces teleósteos presentan una microbiota autóctona que coloniza la superficie del tracto digestivo y mantiene una relación simbiótica de mutualismo y comensalismo con el hospedero (Wong y Rawls 2012, Hooper *et al.* 2012, Llewellyn *et al.* 2014, Li *et al.* 2015). Debido al desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS), hoy es posible determinar la composición taxonómica de todos los microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal de los peces, y al mismo tiempo, es posible predecir la función de los genes expresados por los microorganismos que habitan en el intestino, mediante la secuenciación total de DNA presente o metagenoma (Ghanbari *et al.* 2015, Gómez-Gil *et al.* 2017, Martin y Król 2017, Wang *et al.* 2018). La microbiota podría verse influenciada por diversos factores, especialmente la dieta o el nivel trófico, las condiciones ambientales (como la salinidad, temperatura, etc.), el estatus nutricional del pez, la edad o su filogenia (Sullam *et al.* 2012, Nelson *et al.* 2013, Wu *et al.* 2013, Miyake *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016, Dehler *et al.* 2017, Tarnecki *et al.* 2017, Bruni *et al.* 2018, Zhao *et al.* 2020b, Foosmark *et al.* 2021). Al respecto, diversas investigaciones han demostrado que la composición de la microbiota del tracto digestivo de los peces puede ser modificada mediante el uso de suplementos dietarios como los probióticos y prebióticos que permiten promover el crecimiento y la salud de los organismos, propiciando un balance intestinal y resistencia contra las enfermedades frecuentes en los sistemas intensivos de cultivo (Kesarcodi-Watson *et al.* 2008, Merrifield *et al.* 2010, Nayak 2010a, Hai 2015, Banerjee y Ray 2017, González-Félix *et al.* 2018, Tarnecki *et al.* 2019).

De manera que, tanto los probióticos como los prebióticos, son alternativas prometedoras para ser probadas en la alimentación de larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*), puesto que su

inclusión en la dieta permitiría promover el crecimiento y el bienestar de la especie, aminorando los efectos causados por el estrés y con ello la mortalidad presente durante las primeras etapas de desarrollo. Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la inclusión de probióticos y/o prebióticos, en la dieta de larvas de *C. estor* sobre el crecimiento y la supervivencia, así como su influencia en la microbiota.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención de organismos experimentales

Un total de 2,250 larvas de *C. estor* recién eclosionadas fueron proporcionadas por la planta de cultivo de pez blanco del Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Antes de iniciar los experimentos, un lote de inicial de 40 larvas de *C. estor* fueron sacrificadas en agua helada (3 °C), después se enjuagaron con agua destilada, se eliminó el exceso de agua con papel filtro y se pesaron individualmente en una microbalanza (Mettler MC5). Después se determinó su longitud total inicial (mm) con un vernier digital (marca ATAGO, modelo H-7352). Enseguida, todas las larvas se colocaron en un recipiente de aluminio para ser deshidratadas en una estufa de aire forzado a 70 °C durante 24 h y así calcular su peso seco inicial (mg). Al terminar los experimentos, se efectuó el mismo procedimiento para determinar el peso seco final (mg) de las larvas.

2.2 Elaboración de microdietas experimentales e incorporación de probióticos y/o prebióticos

Para evaluar el efecto de la adición de probióticos y prebióticos en microdietas sobre el desempeño (en términos de crecimiento y supervivencia) de las larvas de pez blanco (*C. estor*), y su influencia en la microbiota, se probaron cuatro microdietas experimentales (55% proteína y 21% lípidos) tomando una proporción de proteínas solubles de 278 g Kg⁻¹ de la dieta, previamente probadas exitosamente en larvas de la especie (Martínez-Ángeles *et al.* 2022). Una de las microdietas experimentales fue suplementada únicamente con cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* (LA; FloraFIT, Dupont, México) a una concentración inicial de 1.3 x 10³ UFC/g⁻¹. Una segunda microdieta fue suplementada solamente con prebióticos de pared celular de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg Kg⁻¹) y una tercer microdieta fue suplementada combinando las respectivas concentraciones de *L. acidophilus* y pared celular

(*Saccharomyces cerevisiae*). Estas microdietas fueron comparadas contra larvas alimentadas con una microdieta control (sin probióticos ni prebióticos) y un tratamiento testigo en el que las larvas fueron alimentadas exclusivamente con rotíferos (*B. plicatilis*).

Las microdietas experimentales fueron elaboradas en la planta de producción de alimento balanceado del Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA) de la U. M. S. N. H. en Morelia, Michoacán, México. Para la elaboración de las microdietas, previamente se realizaron los análisis proximales de todos los ingredientes y las microdietas para determinar la humedad (AOAC 2000), proteína bruta (Leco FP-528, método Dumas; Ebeling 1968), lípidos totales (extracto etéreo; Soxtec Avanti 2050) y ceniza después de la combustión a 550 °C (AOAC 2000) (Tabla 7). Cada una de las dietas formuladas fueron fabricadas como microagregados utilizando la microdieta base desarrollada por Martínez-Angeles y colaboradores (2022), usando un secador por aspersión (Niro Atomizer, Copenhagen, Denmark, MOBILE MINOR™ 2014, modelo MM-PSR), con una capacidad de evaporación de 2 kg/h. Para ello, la mezcla líquida homogénea de cada una de las dietas experimentales, fue vaciada en un vaso de precipitado de 1 L, posteriormente fue bombeada con la ayuda de una bomba peristáltica hasta alcanzar la boquilla de nebulización, por medio de la cual el líquido fue atomizado a una presión de atomización de aproximadamente 2.8 bars (kg/cm²), a una velocidad máxima de flujo de alimentación de 25 ml/min, conforme a la metodología descrita por Martínez-Angeles (2016).

Tabla 7. Composición proximal (valores promedio \pm desviación estándar) de las diferentes microdietas utilizadas durante el experimento. **MC:** Microdieta control; **PC:** Pared celular; **LA:** *Lactobacillus acidophilus*; **LA + PC:** *L. acidophilus* y pared celular.

Nivel de proteína / lípidos en la dieta (520 / 220 g Kg ⁻¹)				
Composición proximal (g Kg ⁻¹)	MC	PC	LA	LA + PC
Proteínas	543.3 \pm 0.2	569.5 \pm 0.18	552.8 \pm 0.2	543.3 \pm 0.25
Lípidos	164.1 \pm 0.62	176.3 \pm 0.35	128.2 \pm 0.43	166.0 \pm 0.82

Cenizas	60.1 ± 0.04	67.0 ± 0.17	69.5 ± 0.07	57.3 ± 0.01
Humedad	20.0 ± 0.06	28.1 ± 0.23	29.8 ± 0.13	26.1 ± 0.22
Ingredientes	Calamar, pescado, krill, albúmina de huevo, WPC80, caseinato de calcio, germen de trigo, aceite de pescado, aceite de canola, almidón de papa, BHT, lecitina, raíz de orozuz en polvo, goma guar, Stay C-35, betaína, extracto de manzana, taurina, colina, premezcla de vitaminas y minerales.			

Para poder suplementar probióticos en las respectivas microdietas experimentales, fue necesario realizar un cultivo bacteriano de *Lactobacillus acidophilus*. Para ello, 0.3 g de la cepa fueron sembrados en 100 mL de medio de cultivo específico para el crecimiento de cepas de *Lactobacillus* (Difco™ *Lactobacilli* MRS Agar) e incubados a una temperatura de 37 °C por 20 horas en una incubadora bacteriológica (FELISA® modelo FE-147). Posteriormente, se tomó una muestra de 0.1 mL de la dilución y fue colocada dentro de una cámara de Neubauer, con la finalidad de poder realizar un conteo del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC mL⁻¹) de las bacterias correspondientes a cada cepa probiótica (*L. acidophilus*).

$$\text{UFC mL}^{-1} = \frac{\text{Bacterias contadas}}{[\text{área de conteo (mm}^2\text{)} * \text{profundidad de la cámara (mm)}]} * \text{dilución}$$

La concentración obtenida a partir del conteo bacteriano, fue directamente añadida a la mezcla líquida homogénea correspondiente para obtener micropartículas secas suplementadas con células vivas de *Lactobacillus acidophilus*.

Para la suplementación de prebióticos en las dietas experimentales, se pesaron 25 mg de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* que fueron añadidos directamente a la dieta formulada correspondiente, antes de iniciar el procedimiento de elaboración y posterior secado por aspersión de las mismas.

Finalmente, una microdeta adicional fue enriquecida combinando la cepa probiótica de *L. acidophilus* y prebióticos de pared celular de levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*),

siguiendo el mismo procedimiento de elaboración que el resto de las microdietas experimentales.

2.3 Diseño experimental

Este experimento consistió de 5 tratamientos de alimentación con tres repeticiones cada uno, teniendo un total de 15 unidades experimentales. En cada repetición se sembraron lotes de 150 larvas recién eclosionadas distribuidas aleatoriamente. A lo largo del experimento (32 días) se mantuvo un fotoperiodo de luz continua (24L:0D) (Martínez-Chávez *et al.* 2014). El sistema experimental, consistió en un sistema de recirculación (RAS) constituido por 15 tanques de 2 L elaborados con tubos de PVC y malla de 40 micras, aireadores, 3 sedimentadores y un filtro biológico con capacidad de 50 L de agua. La temperatura fue de 17.61 ± 1.37 °C, un pH de 8.1 ± 0.06 y una salinidad de 6.70 ± 1.39 g L⁻¹ (sal marina Instant Ocean®). Los tratamientos de alimentación de larvas serán descritos a continuación:

- **T1:** Las larvas de *C. estor* fueron alimentadas *ad libitum* durante los primeros 4 días con rotífero (*Brachionus plicatilis*). Posteriormente del día 5 al 20 se realizó una coalimentación con rotíferos y la microdieta experimental suplementada con *L. acidophilus* a una concentración de 1.3×10^3 UFC g⁻¹. La alimentación se realizó cuatro veces al día cada dos horas (09:00, 11:00, 13:00 y 15:00 h). A partir del día 21 las larvas fueron destetadas y alimentadas manualmente (cada hora durante las 24 horas del día) con la microdieta, a saciedad aparente, hasta los 32 dpe.
- **T2:** El protocolo de alimentación se realizó de la misma manera que en T1, pero la microdieta experimental utilizada contenía prebióticos de pared celular de *S. cerevisiae* a una concentración de 25 mg kg⁻¹ de la dieta.
- **T3:** Siguiendo el mismo protocolo de alimentación, las larvas de *C. estor* fueron destetadas con la microdieta experimental que combinaba *L. acidophilus* (1.3×10^3 UFC g⁻¹) y pared celular de *S. cerevisiae* (25 mg kg⁻¹).
- **T4 (Tratamiento control negativo):** El protocolo de alimentación se realizó de la misma manera que en los tratamientos anteriores, pero esta vez las larvas fueron destetadas con la microdieta control.
- **T5 (Testigo):** Las larvas fueron alimentadas dos veces al día únicamente con *Brachionus plicatilis* a saciedad aparente durante los 32 días experimentales.

2.4 Crecimiento y supervivencia de larvas de *C. estor*

Una vez finalizado el experimento, se evaluó el crecimiento en términos de peso seco (mg), peso ganado individual (PGI, mg día⁻¹), peso ganado (PG, %), longitud total (LT, mm), tasa de crecimiento específico (TCE) y la tasa de conversión alimenticia (TCA) y la supervivencia al cabo de 32 días de alimentación. Todos estos parámetros fueron calculados utilizando las siguientes ecuaciones:

$$PG (\%) = (\text{Peso final individual} - \text{Peso inicial individual} / \text{Peso inicial individual}) * 100$$

$$PG (\text{mg}) = \text{Peso final individual (mg)} - \text{Peso inicial individual (mg)}$$

$$PGI (\text{mg día}^{-1}) = PG (\text{mg}) / \text{tiempo (días)}$$

$$TCE = (\text{Peso final individual} - \text{Peso inicial individual}) * 100 / \text{tiempo (días)}$$

$$\text{Consumo de alimento (mg día}^{-1}) = [\text{Consumo de alimento por tanque (mg)} / \text{número de larvas}] / \text{Tiempo (días)}$$

$$TCA = \text{Consumo de alimento (mg día}^{-1}) / PGI (\text{mg día}^{-1})$$

$$S (\%) = (\text{número final de larvas por tanque} / \text{número inicial de larvas por tanque}) * 100$$

2.5 Análisis de datos de crecimiento y supervivencia

Los resultados obtenidos de crecimiento y supervivencia se sometieron a un análisis de varianza ANOVA a una vía, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Finalmente, se compararon las medias entre los diferentes tratamientos evaluados mediante pruebas de Tukey ($\alpha = 0.05$), con ayuda del Software SigmaPlot (Versión 14.5).

2.6 Análisis metagenómico 16S ribosomal

2.6.1 Evaluación de la microbiota

Para estimar la microbiota del tracto digestivo de las larvas de *C. estor*, se llevó a cabo un muestreo al final del experimento por triplicado para cada tratamiento de alimentación evaluado. Para ello, se tomaron pools de 4 larvas por replica, es decir, se obtuvieron 12 larvas (sin cabeza) por tratamiento. Por lo tanto, se obtuvieron un total de 60 larvas para realizar la extracción de DNA. Todas las larvas muestreadas fueron enjuagadas unos segundos en hipoclorito de sodio al 0.05% y PBS, y posteriormente fueron colocadas en tubos eppendorf con etanol al 96% (1:9

v/v) para ser preservadas en el ultracongelador a -80 °C. La extracción de DNA metagenómico se realizó por el método de buffer bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) para adquirir DNA no fragmentado y de alta calidad.

Para el análisis de la microbiota del DNA obtenido, se llevó a cabo una PCR para amplificar una región de ≈ 200 pb correspondiente a la región V3 del gen 16S ribosomal (16S rRNA) con adaptadores específicos para la plataforma Illumina y con la ayuda de una segunda PCR, a las muestras se le añadieron índices específicos para secuenciarlas en conjunto (pool), para posteriormente poder separarlas bioinformáticamente. Y con ello, adquirir un mínimo de 30,000 secuencias por muestra. Para el análisis de la microbiota se prepararon librerías con el DNA obtenido por medio de tagmentación mediante el kit Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina). Cada una de las muestras fue marcada con índices específicos para secuenciarlas en conjunto y luego realizar los análisis bioinformáticos. Por lo que se obtuvieron mínimo un millón de secuencias por muestra.

2.7 Secuenciación

Las muestras fueron secuenciadas en la plataforma Illumina Miniseq por 300 ciclos (2x150) conforme a los protocolos del Laboratorio de Genómica Microbiana perteneciente al Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA).

2.8 Análisis bioinformático

Los resultados de la secuenciación fueron analizados con scripts propios (https://github.com/GenomicaMicrob/metagenomic_pipeline). Posteriormente, se usaron pair-end_cleaner (ver. 0.9.7) para la limpieza y ensamblaje de las lecturas en una sola secuencia de 200-250 bases. Las muestras correspondientes a la microbiota fueron limpiadas de secuencias quiméricas mediante chimera_detector (ver. 1.3.3) antes de ser clasificadas con QIIME 1.9 o mg_classifier (ver. 1.0.0) para la asignación de Unidades Taxonómicas Operativas (OTU's, por sus siglas en inglés) y estimación de la diversidad bacteriana. Se calcularon curvas de rarefacción e índices de diversidad alfa y beta con PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>). Las muestras de la microbiota se clasificaron con SUPER-FOCUS (<https://github.com/metageni/SUPER-FOCUS>) para asignar funciones a los genes o fracciones de genes encontradas en las secuencias.

2.9. Estimación de alfa y beta diversidad

Todos los análisis estadísticos correspondientes a la microbiota del tracto digestivo de las larvas de *C. estor* fueron realizados en el software R versión 4.0.5 (<https://www.r-project.org/>). Para evaluar la diversidad de las especies que conforman la microbiota intestinal de larvas de *C. estor*, se determinaron los índices de Chao1 y Shannon como indicadores de la riqueza y/o diversidad de especies bacterianas en las diferentes muestras (α -diversidad). Para ello, se determinó la normalidad y homocedasticidad de los datos mediante las pruebas Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. Posteriormente se realizó un análisis de varianza ANOVA a una vía de ambos índices de diversidad, seguido de una prueba *post hoc* de Tukey para comparar las medias entre los distintos tratamientos, y determinar si existían diferencias significativas ($p < 0.05$). Las diferencias presentes en la estructura de la comunidad bacteriana presente en tracto intestinal de las larvas, fueron visualizadas mediante un gráfico de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés), utilizando la función “metaMDS” y los paquetes informáticos “MASS” y “vegan” versión 2.5-7. El índice de Bray-Curtis fue usado para medir las diferencias de abundancia de los taxones que componen la muestra e ignorar aquellos casos en que el taxón estaba ausente en las mismas. Adicionalmente, se efectuó un análisis de similitud (ANOSIM con 999 permutaciones y un valor $\alpha = 0.05$), con el propósito de probar si existe una diferencia estadística en la composición de las comunidades microbianas intestinales de dos o más muestras (β -diversidad). Finalmente, se determinó la microbiota núcleo, es decir, la proporción de la comunidad de bacterias compartida entre los distintos tratamientos de alimentación de larvas de *C. estor*, identificando las unidades taxonómicas operativas (OTU’s) compartidas entre las réplicas y el número de secuencias obtenidas en el análisis bioinformático, para posteriormente poder visualizar las interacciones presentes entre las distintas comunidades bacterianas mediante el análisis de conjuntos e intersecciones, llevado a cabo con el paquete UpSetR (Conway *et al.* 2017).

3. Resultados

3.1 Crecimiento y supervivencia de larvas de *Chirostoma estor*

Los resultados obtenidos en la presente investigación, mostraron que las larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*) alimentadas únicamente con rotíferos (*B. plicatilis*) presentaron un crecimiento, en términos de peso seco, significativamente mayor en comparación con aquellas alimentadas con microdietas suplementadas con *L. acidophilus*, pared celular y la combinación de ambos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las larvas alimentadas

con presas vivas y la microdieta control. En lo que se refiere a la longitud total de las larvas, únicamente se observaron diferencias significativas entre las larvas alimentadas con rotíferos y las suplementadas con *L. acidophilus* (Fig. 9).

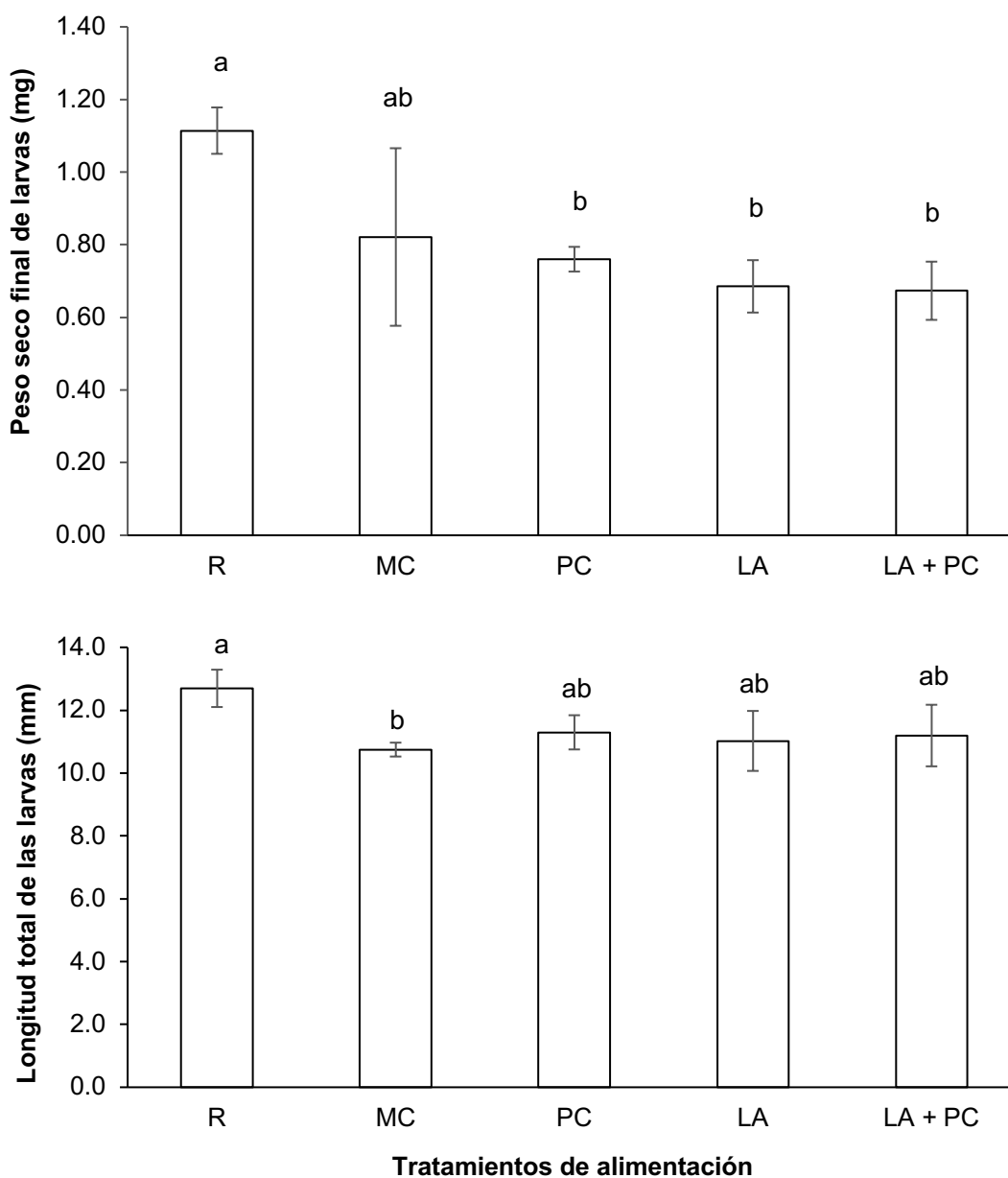


Figura 9. Peso seco (mg) y longitud total individual (mm) de las larvas de pez blanco sometidas a diferentes tratamientos de alimentación. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos. **R:** Rotíferos; **MC:** Microdieta control; **PC:** Pared celular; **LA:** *Lactobacillus acidophilus*; **LA + PC:** *L. acidophilus* y pared celular.

No obstante, al analizar la supervivencia las larvas alimentadas con microdietas enriquecidas con *L. acidophilus* a una concentración de 1.3×10^3 UFC g^{-1} de la dieta, presentaron una supervivencia significativamente mayor comparada con el resto de los tratamientos. Aunque, no se observaron diferencias significativas entre las larvas alimentadas con microdietas adicionadas con pared celular, *L. acidophilus* con pared celular, la microdieta control y las alimentadas exclusivamente con rotífero (Fig. 10).

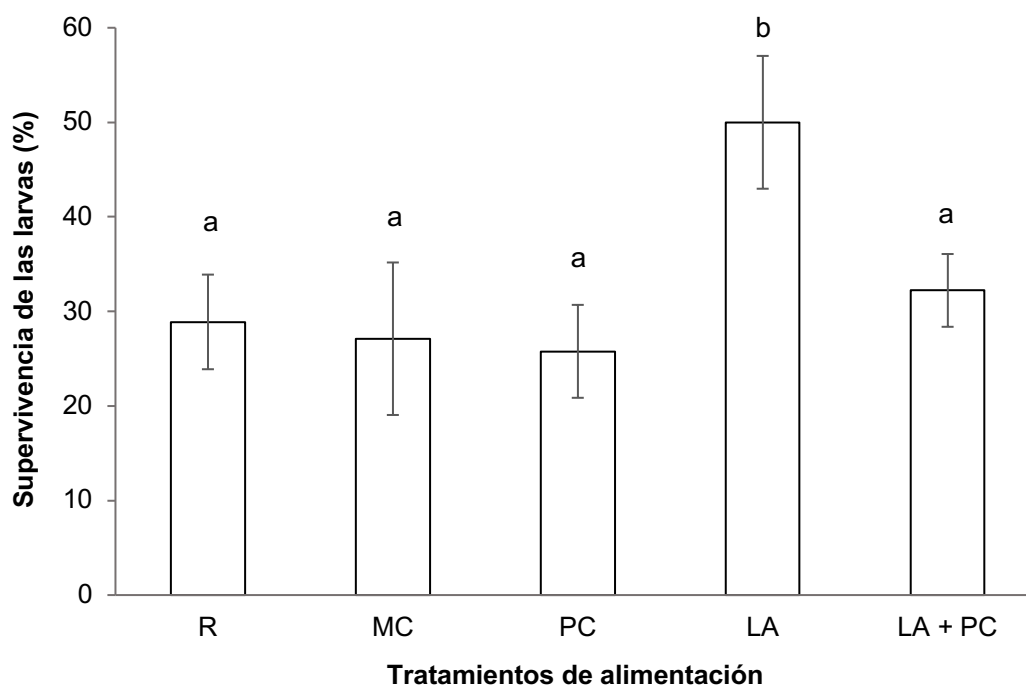


Figura 10. Supervivencia de las larvas de *C. estor* sometidas a los diferentes tratamientos de alimentación. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos. **R:** Rotíferos; **MC:** Microdieta control; **PC:** Pared celular; **LA:** *Lactobacillus acidophilus*; **LA + PC:** *L. acidophilus* y pared celular.

3.2 Parámetros de crecimiento de larvas de *C. estor*

La Tabla 8 muestra un aumento significativo en el peso seco final y el porcentaje de peso ganado en las larvas de pez blanco alimentadas únicamente con rotíferos cuando son comparadas con los demás tratamientos. El resto de los tratamientos no presentan diferencias. Además, se pudo constatar que las larvas de *C. estor* alimentadas con rotíferos, con la microdieta control y con la

adicionada con pared celular, presentaron una tasa de crecimiento específico significativamente mayor en comparación con las larvas suplementadas con *L. acidophilus* y aquellas alimentadas con la combinación de *L. acidophilus* y pared celular. Por otro lado, en lo que respecta al consumo de alimento y la tasa de conversión alimenticia, no se mostraron diferencias significativas entre las larvas alimentadas con las distintas microdietas.

Tabla 8. Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia de larvas de *C. estor*. **R:** Rotíferos; **MC:** Microdieta control; **PC:** Pared celular; **LA:** *Lactobacillus acidophilus*; **LA + PC:** *L. acidophilus* y pared celular. Los datos se expresan en promedio \pm desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre columnas.

Valores promedio	Tratamientos de alimentación				
	R	MC	PC	LA	LA + PC
PSI (mg)	0.1508 \pm 0.01	0.1508 \pm 0.01	0.1508 \pm 0.01	0.1508 \pm 0.01	0.1508 \pm 0.01
PSF (mg)	1.114 \pm 0.064 ^a	0.821 \pm 0.244 ^{ab}	0.760 \pm 0.034 ^b	0.685 \pm 0.072 ^b	0.673 \pm 0.080 ^b
CA (mg día ⁻¹)	ND	0.0384 \pm 0.006	0.0482 \pm 0.003	0.0506 \pm 0.003	0.0472 \pm 0.005
PSGI (mg día ⁻¹)	0.0310 \pm 0.05	0.0171 \pm 0.03	0.0190 \pm 0.04	0.0200 \pm 0.06	0.0163 \pm 0.07
PG (%)	86.46 \pm 0.06 ^a	81.63 \pm 0.24 ^b	80.15 \pm 0.03 ^b	77.99 \pm 0.07 ^b	77.59 \pm 0.08 ^b
TCE (% día ⁻¹)	6.666 \pm 0.050 ^a	5.646 \pm 0.201 ^a	5.390 \pm 0.250 ^a	5.046 \pm 0.065 ^b	4.986 \pm 0.075 ^b
LTF (mm)	12.7 \pm 0.56 ^a	10.7 \pm 0.22 ^b	11.3 \pm 0.54 ^{ab}	11.0 \pm 0.95 ^{ab}	11.2 \pm 0.98 ^{ab}
TCA	ND	2.249 \pm 0.06	2.531 \pm 0.03	2.526 \pm 0.03	2.893 \pm 0.05

PSI: Peso seco individual, PSF: peso seco corporal final, CA: consumo de alimento individual, PSGI: peso seco ganado individual, PG: peso ganado %, TCE: tasa de crecimiento específico, LTF: longitud total final, TCA: tasa de conversión alimenticia, ND: No determinado.

R: Rotífero

MC: Microdieta control.

PC: Microdieta base suplementada con pared celular de *S. cerevisiae* (25 mg Kg⁻¹ de dieta).

LA: Microdieta suplementada con *L. acidophilus*

LA + PC: Microdieta suplementada con *L. acidophilus* (1.3 x 10³ UFC / g de dieta) y pared celular (25 mg Kg⁻¹ de dieta).

3.3 Influencia de la suplementación de probióticos y prebióticos en microdietas para larvas de pez blanco

3.3.1 Análisis de diversidad de la microbiota intestinal de larvas de *C. estor*

La α -diversidad estimada mediante índice de Chao1 para determinar el número de especies que conforman la comunidad microbiana, mostró diferencias significativas entre los tratamientos de larvas alimentadas con la microdieta control, las suplementadas con la combinación *L. acidophilus* y pared celular de levadura (*S. cerevisiae*) y las alimentadas exclusivamente con rotífero, en comparación con aquellas que consumieron las microdietas suplementadas con pared celular y/o *L. acidophilus*. Sin embargo, de acuerdo con el índice de Shannon no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de alimentación de larvas de *C. estor* (Fig. 11).

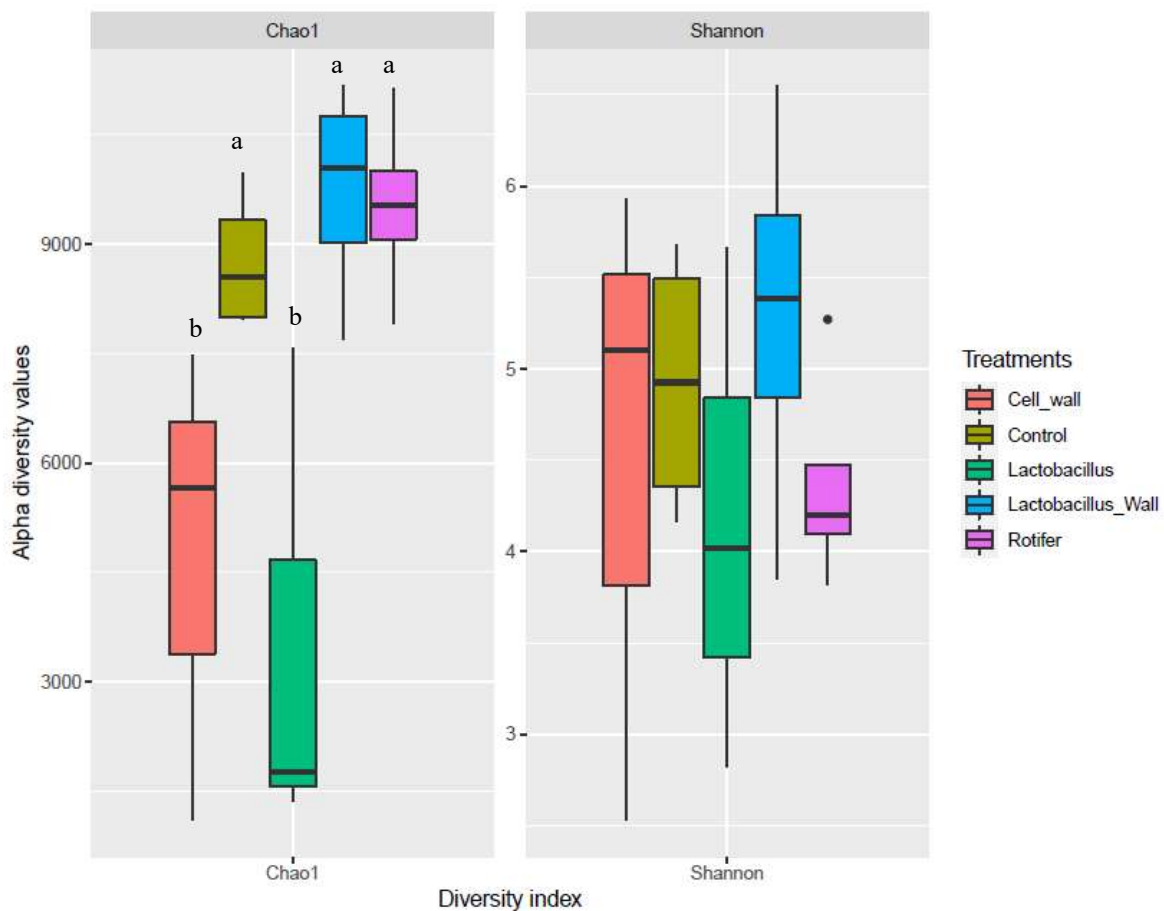


Figura 11. Índices de α -diversidad calculados en el software R (ver. 4.0.5). Letras indican diferencias significativas entre tratamientos de alimentación de larvas de pez blanco ($p < 0.05$).

Por otra parte, la manera más eficiente de visualizar la β -diversidad, o que tan diferentes son las muestras entre sí, es mediante un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS). Es por ello que, se elaboró un gráfico NMDS para comparar la similitud de la

microbiota del tracto digestivo de larvas de *C. estor*, alimentadas con las diferentes microdietas suplementadas, con aquellas que fueron alimentadas con rotíferos y la microdieta control. En el NMDS fue posible visualizar tendencias distintas en la estructura de las comunidades bacterianas que conforman la microbiota de larvas de pez blanco, especialmente cuando fueron destetadas con microdietas suplementadas solo con *Lactobacillus* (*L. acidophilus*) y/o pared celular de levadura (*S. cerevisiae*), mientras que las larvas alimentadas con rotíferos, la microdieta control y la que combina *Lactobacillus* y pared celular, exhibieron una comunidad microbiana bastante similar (Fig. 12).

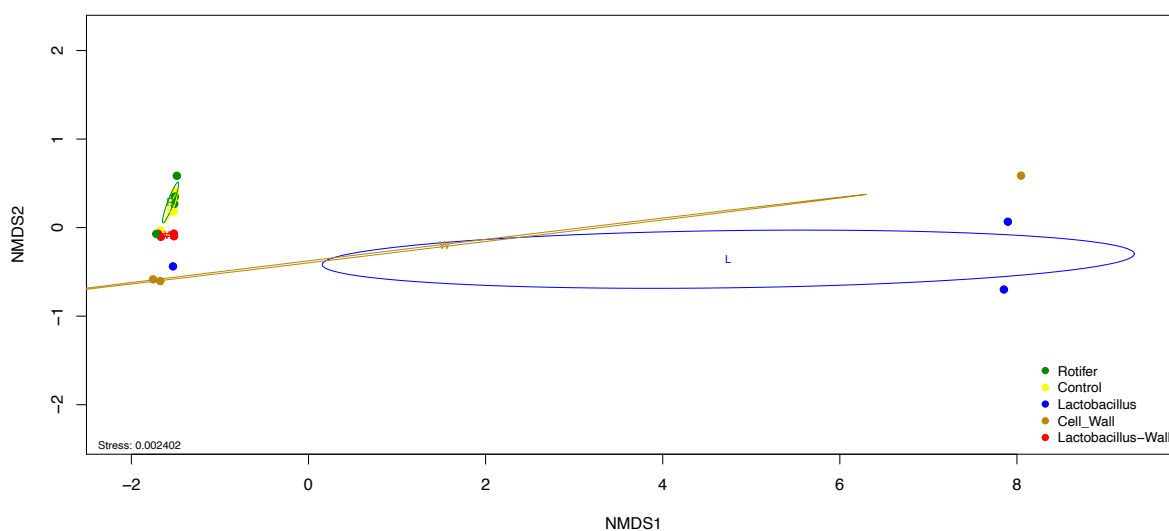


Figura 12. El gráfico NMDS muestra las diferencias de la comunidad microbiana entre los distintos tratamientos de alimentación de larvas. Las distancias entre la comunidad fueron determinadas mediante el índice de disimilitud de Bray-Curtis. Estrés= 0.002402.

El análisis de similitud (ANOSIM) refuerza los resultados observados en el NDMS, mostrando que las comunidades que constituyen la microbiota de las larvas difieren significativamente ($R=0.293$; $p=0.03$), particularmente entre las larvas alimentadas con microdietas suplementadas con *L. acidophilus* y/o pared celular, en comparación con las larvas alimentadas con rotíferos, la microdieta control y la combinación de *L. acidophilus* y pared celular, las cuales exhibieron una mayor similitud en su composición microbiana (Fig. 13).

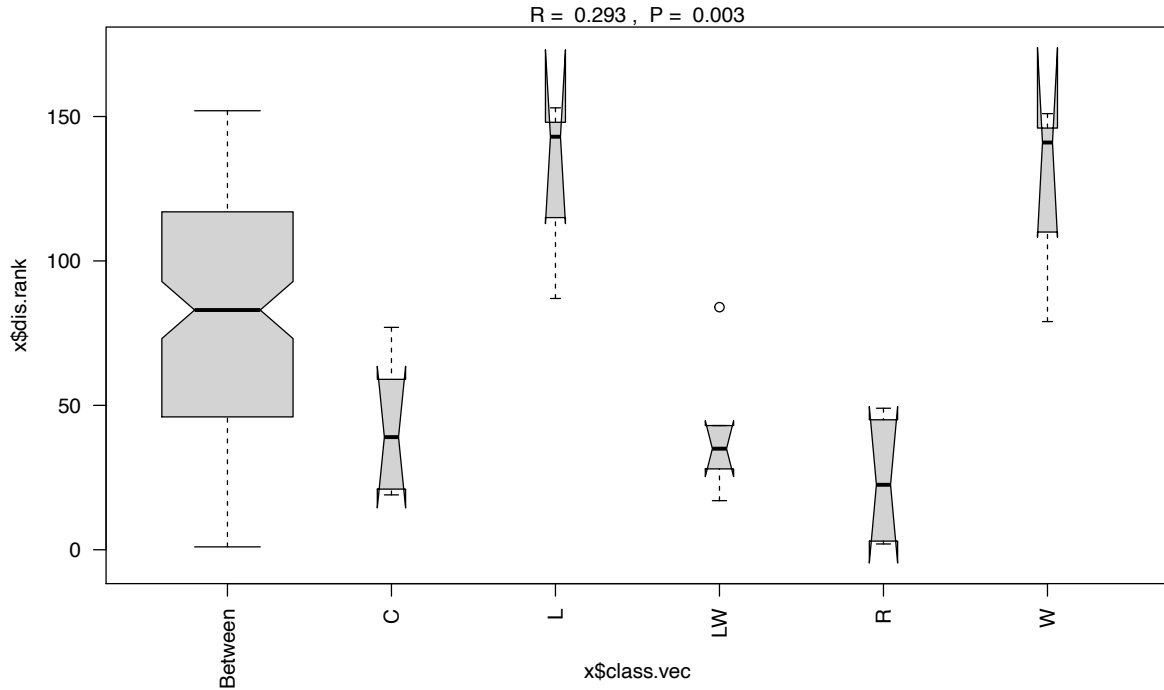


Figura 13. Análisis de similitud (ANOSIM) de la microbiota de larvas de *C. estor* sometidas a distintos tratamientos de alimentación. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.

Las curvas de rarefacción estimadas en el presente estudio, muestran que se obtuvieron la mayoría de secuenciaciones posibles para cada uno de los tratamientos de alimentación de larvas de *C. estor*, por lo que la microbiota de las mismas estuvo bien representada en todas las muestras analizadas (Fig. 14).

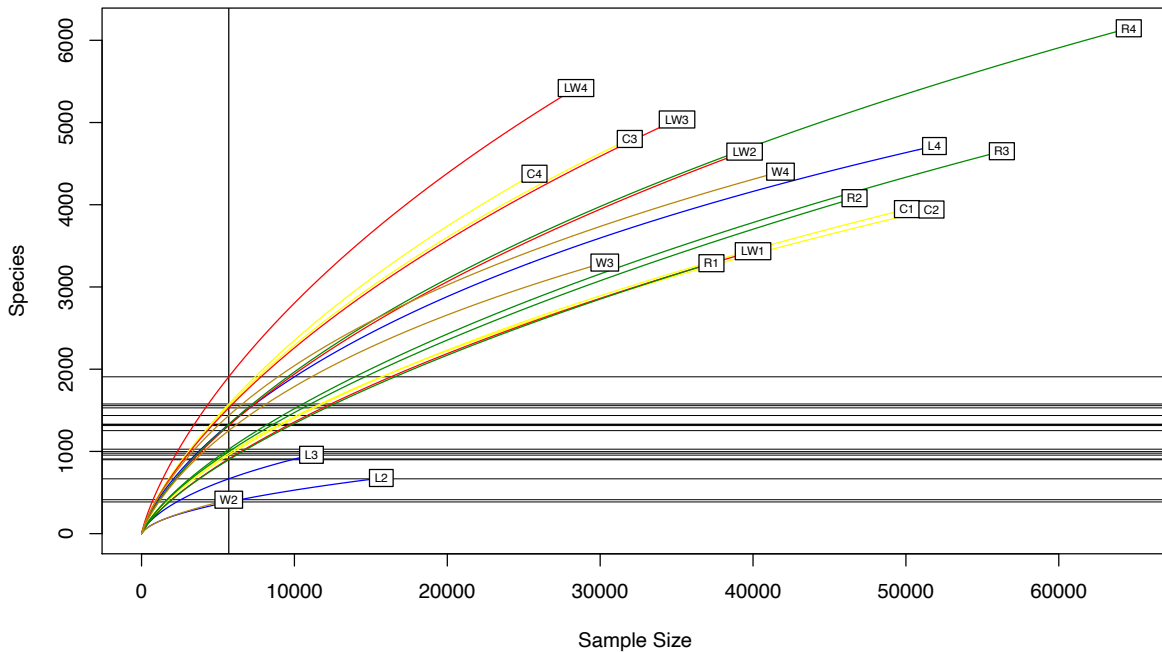


Figura 14. Curvas de rarefacción de las comunidades bacterianas muestreadas en el tracto intestinal de larvas de pez blanco (*C. estor*), sometidas a distintos tratamientos de alimentación. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.

3.3.2 Composición del microbioma intestinal de larvas de *C. estor*

En el presente estudio se registraron un total de 46 phyla, donde la microbiota del tracto digestivo de las larvas de *C. estor* estuvo generalmente dominada por bacterias pertenecientes a los phyla Proteobacteria (39.95%), seguido de Chloroflexi (14.20%), Planctomycetota (12.55%), Acidobacteriota (9.27%) y Firmicutes (7.70%); que en conjunto, representan más del 83% de la abundancia total de la microbiota presente en las larvas de pez blanco. Es importante señalar que cuando las larvas fueron alimentadas con microdietas suplementadas exclusivamente con cepas probióticas de *L. acidophilus*, se observaron cambios importantes en la composición de la microbiota la cual estuvo ampliamente dominada por bacterias de los phyla Proteobacteria (64.36%) y Planctomycetota (17.59%), representando entre ambos aproximadamente el 82% de la abundancia bacteriana detectada en larvas de *C. estor*. Mientras que, las larvas alimentadas con microdietas adicionadas individualmente con prebióticos de

pared celular (*S. cerevisiae*), exhibieron una microbiota compuesta especialmente por taxones de los phyla Proteobacteria (58.51%) y Planctomycetota (14.20%), constituyendo por lo menos el 72% de la abundancia que comprende la microbiota de las larvas (Fig. 15).

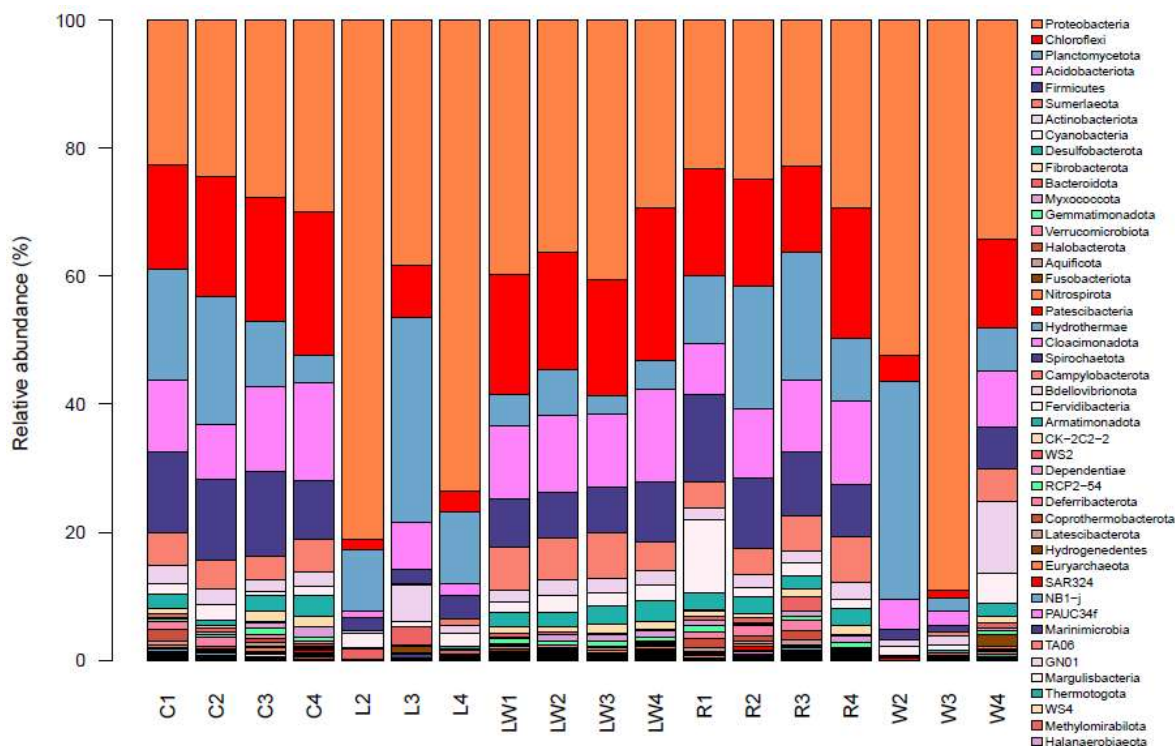


Figura 15. Composición bacteriana al nivel taxonómico de phylum de la microbiota de larvas de *C. estor* sometidas a distintos tratamientos de alimentación. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.

Por otro lado, a nivel de género se identificaron 468 taxones, de los cuales los miembros de *Nitrosomonas* (13.9%), *JG30-KF-CM45* (12.62%), *Providencia* (11.31%), *Luteitalea* (4.79%) y *Ruminococcus* (4.77%), los cuales constituyen casi el 50% de la composición bacteriana de la microbiota del tracto digestivo de larvas de *C. estor*. Sin embargo, la suplementación individual de *L. acidophilus* y/o pared celular en las microdietas promovió cambios en la estructura de la comunidad bacteriana, al aumentar sustancialmente la abundancia del género *Providencia* llegando a representar hasta el 33% de las comunidades bacterianas que conforman la microbiota de las larvas de pez blanco (Fig. 16).

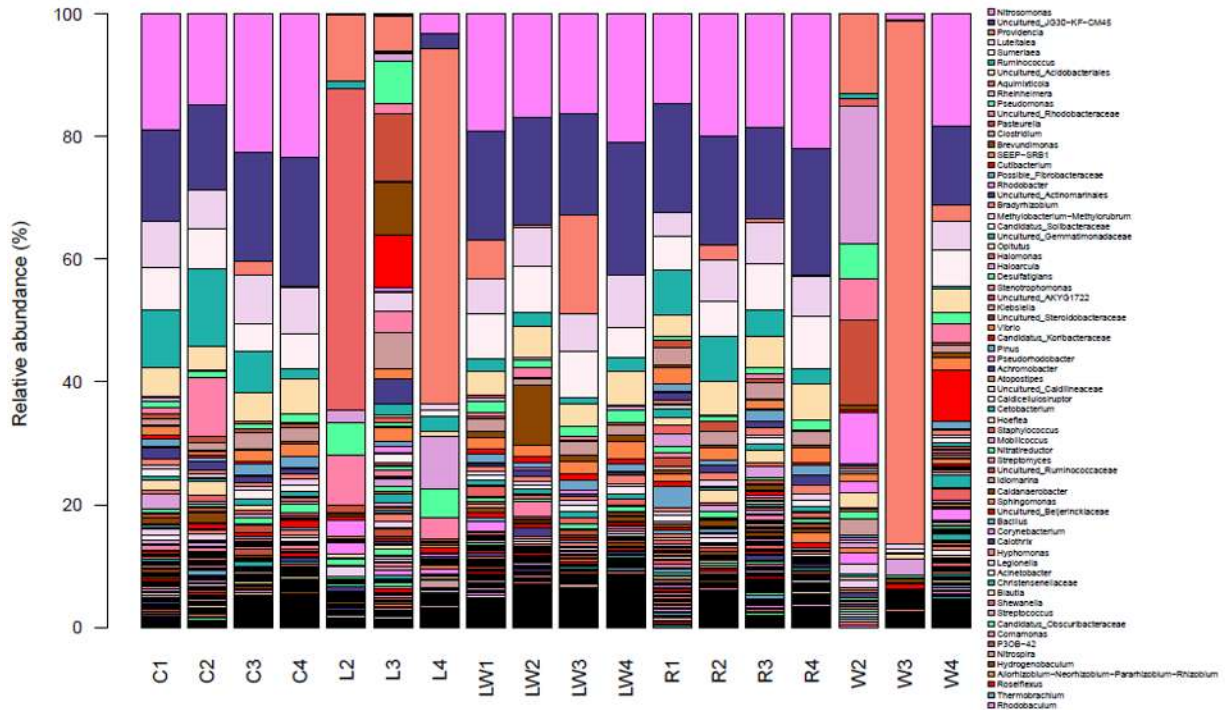


Figura 16. Composición bacteriana al nivel taxonómico de género de la microbiota de larvas de *C. estor* sometidas a distintos tratamientos de alimentación. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.

Debido a la gran variedad de géneros identificados en el presente estudio, se determinó la microbiota núcleo (core microbiota, en inglés), que hace referencia a la proporción de la comunidad de bacterias (OTU's) compartidas entre los distintos tratamientos de alimentación de larvas de *C. estor*. Los resultados obtenidos a partir del análisis de conjuntos e intersecciones presentes entre los OTU's y los tratamientos de alimentación evaluados, mostraron que la microbiota núcleo de las larvas de pez blanco estuvo compuesta por 102 géneros, que comprenden el 21.79% del total de géneros reportados en esta investigación tomando como base las intersecciones exhibidas entre las comunidades bacterianas y los tratamientos de alimentación. Estos datos fueron representados visualmente mediante el gráfico UpSet, para mostrar todos microorganismos a nivel taxonómico de género que habitan en las larvas de la especie. Donde cada conjunto de bacterias que, forma parte de una intersección determinada, es interpretado con un círculo de color negro en la celda de la matriz correspondiente y las líneas negras que conectan estos círculos indican los OTU's compartidos entre tratamientos. Pero cuando un conjunto bacteriano no es parte de la intersección, se muestra con un círculo de color gris claro (Fig. 17).

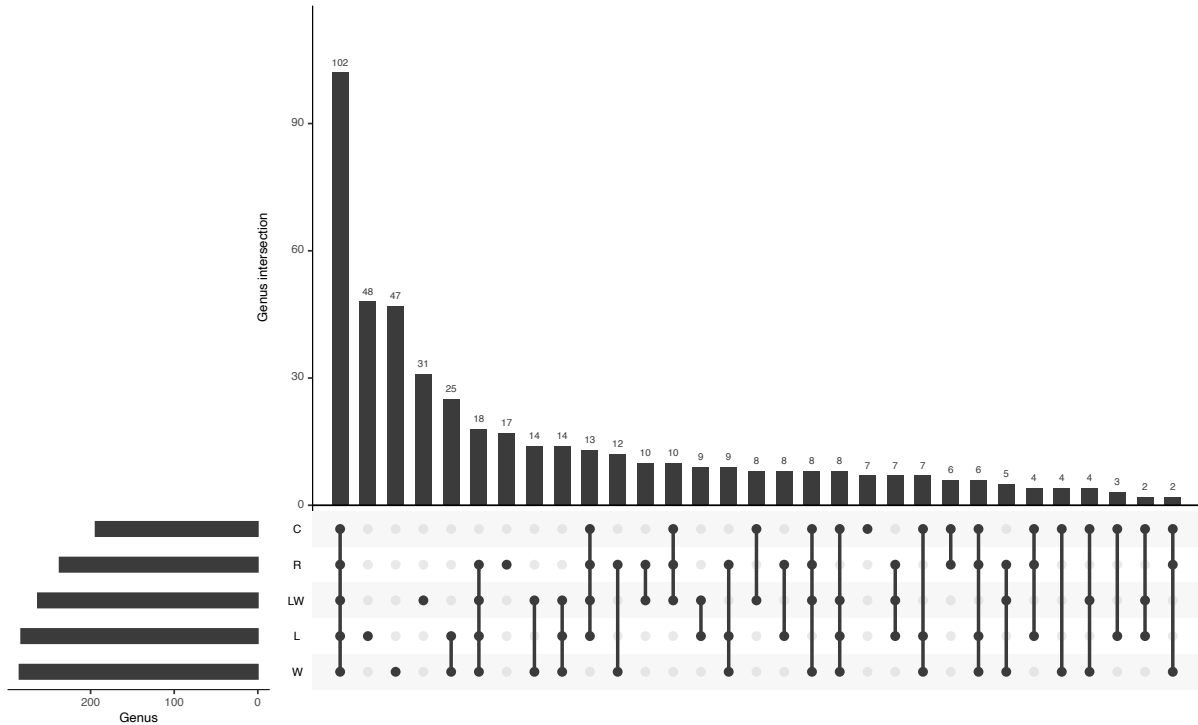


Figura 17. Gráfico UpSet representando la presencia de géneros bacterianos (OTU's) en todos los tratamientos de alimentación de larvas de *C. estor*. **C:** Control; **L:** *Lactobacillus acidophilus*; **LW:** *L. acidophilus* con Pared celular; **R:** Rotífero y **W:** Pared celular.

Por otro lado, de acuerdo con el gráfico de UpSet es importante señalar que cada una de las microdietas evaluadas ejerce un efecto interesante en la microbiota de las larvas de *C. estor*, debido a que es posible detectar géneros bacterianos u OTU's exclusivos (representados con un solo punto de color negro) para cada tratamiento de alimentación. Donde el mayor número de géneros únicos fue detectado en las larvas alimentadas con microdietas suplementadas solo con *L. acidophilus* y pared celular, con 48 y 47 géneros cada uno. Seguido de la suplementación combinada de probióticos y prebióticos en la microdieta, el tratamiento de larvas alimentadas con rotíferos y por último las larvas alimentadas con la microdieta control con 31, 17 y 7 géneros bacterianos únicos, respectivamente (Fig. 17).

4. Discusión

En la actualidad, es bien sabido que el desarrollo eficiente y la rentabilidad de la industria acuícola depende fundamentalmente de la tasa de crecimiento y supervivencia de los peces cultivados (Chapagain *et al.* 2019), pese a que se han reportado resultados prometedores en

términos de crecimiento y/o supervivencia de numerosas especies de peces cuando son alimentados con dietas suplementadas con cepas probióticas (Nayak 2010a, Hai 2015, Dawood *et al.* 2019, Wang *et al.* 2019, Waiyamitra *et al.* 2020), el uso de probióticos en la acuicultura sigue siendo controversial, ya que la mayoría de ellos han sido probados en tratamientos *in vitro* sin considerar que la fisiología de un organismo *in vivo* podría ser totalmente distinta al proceso metabólico mostrado en pruebas de cultivo *in vitro*, sin olvidar que existen interacciones microbianas mucho más complejas en condiciones *in vivo* (Pirarat *et al.* 2015).

La colonización del tracto intestinal mediante la aplicación de cepas probióticas en peces de cultivo suele ser más propicia durante sus primeros estadios de desarrollo (Llewellyn *et al.* 2014, Xia *et al.* 2019). Aún cuando los prebióticos han recibido menos atención en relación con los probióticos, diversas investigaciones sostienen que el uso de prebióticos en la acuicultura también propicia un incremento en los factores asociados al crecimiento (tasa de crecimiento específico, porcentaje de peso ganado, la conversión alimenticia, etc.) de los peces cultivados comercialmente (Gültepe *et al.* 2012, Hoseinifar *et al.* 2013, Tuan *et al.* 2013, Chen *et al.* 2014). Asimismo, los prebióticos tienen la facultad de activar la respuesta inmune del hospedero y reducen el riesgo de contraer enfermedades durante las primeras etapas de desarrollo (Vandenplas *et al.* 2015, Vallejos-Vidal *et al.* 2016, Mohan *et al.* 2019). Por lo anterior los prebióticos, son complementos alimenticios de gran importancia en la acuicultura al prevenir brotes de enfermedades y fortalecer la salud de los peces (Carballo *et al.* 2019).

En el presente estudio, observamos que la suplementación individual de *L. acidophilus* en la microdieta promueve un aumento significativo en la supervivencia de las larvas de *C. estor*, en comparación con el resto de los tratamientos de alimentación, incluso fue mayor a las larvas alimentadas exclusivamente con rotífero (*B. plicatilis*). Porcentajes de supervivencia similares han sido reportados en alevines de *Chirostoma humboldtianum* cuando son suplementados con cepas probióticas de *Lactobacillus johnsonii* (Vázquez-Silva *et al.* 2017) y alevines de *Cyprinus carpio* alimentados con dietas adicionadas con *L. acidophilus* (Dhanaraj *et al.* 2010). Esto último, podría ser resultado de la habilidad natural de los lactobacilos de colonizar el tracto intestinal durante las primeras etapas de vida de los peces e incrementar de forma significativa la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune (*IFN α* , *IL-6*, *IRF7*, *MyD88*, *TNF- α* , *TLR7*, *TLR9*, etc.) y, de algunos parámetros relacionados con el sistema inmune innato, entre los que destacan la actividad fagocítica, de lisozimas, la producción de leucocitos, linfocitos y

trombocitos en el hospedero, etc., convirtiéndolos en organismos más inmunocompetentes contra una gran diversidad de bacterias potencialmente patógenas, respondiendo de manera eficiente a las condiciones de estrés a las que comúnmente son sometidos durante su cultivo, disminuyendo así su mortalidad (Al-Dohail *et al.* 2009, El-Rahman *et al.* 2009, Jatobá *et al.* 2011, Hoseinifar *et al.* 2015, Yu *et al.* 2017, Zhai *et al.* 2017, Xia *et al.* 2019). No obstante, es fundamental continuar con la realización de estudios que permitan evaluar la activación y/o estimulación de la respuesta inmune del hospedero, cuando las larvas son alimentadas con microdietas suplementadas con probióticos.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento en las larvas de *C. estor* alimentadas con microdietas suplementadas con cepas probióticas de *L. acidophilus* (1.3×10^3 UFC g^{-1} de la dieta) y la microdieta control. Resultados similares han sido reportados en alevines de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), en donde no fue posible observar diferencias significativas en el crecimiento de los peces, cuando fueron alimentados con dietas suplementadas con *L. acidophilus* (Villamil *et al.* 2014). Si bien es cierto que concentraciones (UFC g^{-1}) apropiadas de cepas probióticas en la dieta dependen principalmente de cada especie, las condiciones de cultivo y el estado fisiológico del pez (Merrifield *et al.* 2010), el hecho de que en el presente estudio y en otros, no haya sido posible constatar el efecto promotor de crecimiento de *L. acidophilus* en la dieta, como ha sido descrito en distintas especies de peces, independientemente de su fase de cultivo (Al-Dohail *et al.* 2009, Faramarzi *et al.* 2011, Wang 2011, Hoseinifar *et al.* 2015), podría estar relacionado con la concentración de cepas de *L. acidophilus* adicionada en la microdieta pues esta no alcanzó el intervalo mínimo establecido (10^6 a 10^{10} UFC g^{-1} de la dieta) para poder ejercer su acción promotora en el crecimiento, aumentar la biodisponibilidad de proteínas, nutrientes y estimular la actividad enzimática del hospedero (Nayak 2010a, Ramos *et al.* 2013, Tapia-Paniagua *et al.* 2014, Dawood y Koshio 2016, Ringø *et al.* 2018, Wang *et al.* 2019).

De la misma manera, no hubo diferencias significativas en el crecimiento y la supervivencia de las larvas alimentadas con microdietas adicionadas con prebióticos de pared celular de levadura (*S. cerevisiae*) a una concentración de 25 mg kg^{-1} y la microdieta control. Estos datos se asemejan a los publicados en juveniles de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), alimentados con dietas suplementadas con pared celular de *S. cerevisiae* a una concentración de 100 mg kg^{-1} (Welker *et al.* 2007). La poca eficiencia del uso de pared celular de levadura (*S. cerevisiae*) y

sus componentes como promotor de crecimiento y/o supervivencia encontrada en este estudio, ha sido informada en distintas especies de peces (Selvaraj *et al.* 2005, Burr *et al.* 2010, Ebrahimi *et al.* 2012, Mansour *et al.* 2012). Esta inconsistencia podría depender de la especie cultivada, el periodo de alimentación y la concentración (mg kg^{-1}) de pared celular de levadura utilizada en la dieta (Welker *et al.* 2012, Øverland y Skrede 2016). Al respecto, se ha reportado que para poder ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento y la supervivencia de los peces, es necesario que la pared celular de levadura y/o sus componentes sean adicionados en concentraciones mayores a 1000 mg kg^{-1} de la dieta, dependiendo del estadio de desarrollo de los peces cultivados (Ortuño *et al.* 2002, Torrecillas *et al.* 2007, Gopalakannan y Arul 2010, Abdel-Tawwab 2012, Yu *et al.* 2014). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la concentración de pared celular de levadura (25 mg kg^{-1}) administrada en la microdieta, haya sido insuficiente para promover el crecimiento y la supervivencia de las larvas de *C. estor*. Aunque, es necesario llevar a cabo futuras investigaciones en las que se evalúen distintas concentraciones de pared celular de *S. cerevisiae* y su influencia en el crecimiento y la supervivencia durante el cultivo larvario de la especie.

Asimismo, las larvas alimentadas con la combinación de *L. acidophilus* y pared celular, tampoco exhibieron diferencias significativas en su crecimiento y supervivencia, en comparación con el resto de las microdietas administradas. Esto contrasta con lo reportado por Lara-Flores y colaboradores (2010) en alevines de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), donde se observó que la combinación de *L. acidophilus* con *S. cerevisiae* en la dieta promueve significativamente el crecimiento de los peces en comparación con el grupo control. Adicionalmente, es importante señalar que las larvas de *C. estor* alimentadas únicamente con rotíferos (*B. plicatilis*) presentaron un crecimiento significativamente mayor en comparación con el resto de los tratamientos de alimentación, con excepción de las larvas alimentadas con la microdieta control. Este último dato, es semejante a lo observado en un estudio realizado en larvas de la misma especie, en el cual el rendimiento en el crecimiento de las larvas alimentadas con una dieta microagregada secada por aspersión fue similar a las larvas alimentadas exclusivamente con *B. plicatilis* (Martínez-Angeles *et al.* 2022).

En la actualidad, es ampliamente aceptado que tanto el peso como la salud de los peces pueden ser influenciados por su microbiota intestinal (Brown *et al.* 2012, Clements *et al.* 2014, Ingerslev *et al.* 2014, Tran *et al.* 2017), debido principalmente a que los microorganismos que colonizan

el tracto intestinal de los peces, desempeñan una función fundamental en la capacidad de absorción y digestión eficiente de los nutrientes presentes en la dieta, mediante la secreción de enzimas digestivas, o bien, tienen la habilidad de inhibir la presencia de bacterias potencialmente patógenas a través de la producción de sustancias antimicrobianas (Nayak 2010b, Ganguly y Prasad 2012, Banerjee y Ray 2017a). Generalmente, la microbiota del tracto intestinal de varias especies de peces se encuentra colonizado en su mayoría por bacterias de los phyla Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacteria (Larsen *et al.* 2014, Llewellyn *et al.* 2014, Tarnecki *et al.* 2017), aunque su relevancia podría ser distinta según la especie (Legrand *et al.* 2018, Mente *et al.* 2018).

El análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) llevado a cabo en el presente estudio, nos permitió observar cambios estructurales generales sobre la microbiota en respuesta a la suplementación de probióticos y prebióticos en microdietas para la alimentación de larvas de *C. estor*. Se observan patrones de diferenciación claros entre las comunidades microbianas de las larvas alimentadas con microdietas suplementadas con *Lactobacillus* y/o pared celular, respecto a las que fueron alimentadas únicamente con presas vivas y la microdieta control, donde ambos tratamientos presentaron comunidades microbianas muy similares. Esto sugiere que la adición probióticos y/o prebióticos en dietas microagregadas para la alimentación de larvas de *C. estor*, provoca cambios en la microbiota de los organismos durante las primeras fases de desarrollo de la especie.

A nivel de phylum, la microbiota del tracto digestivo las larvas de *C. estor* estuvo ampliamente dominada por bacterias de los phyla Proteobacteria, Chloroflexi, Planctomycetota, Acidobacteria y Firmicutes. De los cuales Proteobacteria fue el más abundante, independientemente del tratamiento de alimentación. Estos resultados coinciden con la gran abundancia de Proteobacteria registrada en otras especies de peces Atheriniformes (Hughes *et al.* 2017), y en muchas especies de peces dulceacuícolas y marinos (Smriga *et al.* 2010, Li *et al.* 2013, Ghanbari *et al.* 2015, Ou *et al.* 2019, Tyagi *et al.* 2019, Hu *et al.* 2021). Resultados similares a los encontrados en el presente estudio, han sido reportados en adultos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), independientemente del tipo de dieta con la que fueron alimentados (Bruni *et al.* 2018). Cabe destacar que cuando las larvas de *C. estor* fueron alimentadas con microdietas suplementadas individualmente con cepas de probióticas de *L. acidophilus* o prebióticos de pared celular de levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) la proporción

de bacterias del phylum Proteobacteria aumentó considerablemente, constituyendo más de la mitad de la microbiota del tracto digestivo de larvas de la especie, en comparación con el resto de los tratamientos de alimentación evaluados. Esto coincide con la predominancia de Proteobacteria registrada en el tracto gastrointestinal de alevines de *Chirostoma humboldtianum* (Vázquez-Silva *et al.* 2017) y la reportada en larvas de *Solea senegalensis* (Tapia-Paniagua *et al.* 2014) suplementadas con probióticos. Un gran aumento en la abundancia de Proteobacteria también fue detectado en la microbiota intestinal de juveniles de *Oreochromis niloticus* alimentados con dietas enriquecidas con cepas probióticas respecto a la dieta control (Xia *et al.* 2018). Resultados parecidos a los obtenidos en nuestro estudio, se observaron en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas adicionadas con cepas probióticas y/o prebióticos de levadura (González-Félix *et al.* 2018). Contrario a la disminución de Proteobacteria mostrada en la microbiota de juveniles de *Oncorhynchus mykiss* mediante la adición de prebióticos de levadura de cerveza en dietas comerciales (Gonçalves y Gallardo-Escárte 2017); y los bajos niveles de Proteobacterias reportados en las comunidades bacterianas de vertebrados terrestres alimentados con dietas enriquecidas con probióticos y prebióticos (Middelbos *et al.* 2010, Beloshapka *et al.* 2013, Garcia-Mazcorro *et al.* 2017).

La información obtenida en este estudio sugiere que la suplementación de probióticos y/o prebióticos en microdietas formuladas, induce cambios en la microbiota del tracto digestivo de las larvas de *C. estor*, favoreciendo la proliferación de bacterias del phylum Proteobacteria. Esto es relevante debido a que las Proteobacterias intervienen en múltiples funciones metabólicas del intestino, entre las que destacan su participación en el metabolismo de las proteínas, distintos tipos de aminoácidos, carbohidratos y vitaminas presentes en la dieta, al tiempo que activan distintos tipos de mecanismos de defensa, aumentando la supervivencia de las larvas (Swanson *et al.* 2011, Bradley y Pollard 2017, Pereira y Berry 2017, Hu *et al.* 2021). Sin embargo, la gran abundancia de Proteobacteria registrada en larvas de pez blanco, difiere de la reportada en larvas de *Siganus guttatus* colectadas en ambientes eurihalinos (Le *et al.* 2020), así como de las larvas de *Micropterus salmoides* (Zhao *et al.* 2020a) y juveniles de *Salmo salar* cultivados (Villasante *et al.* 2019), cuya microbiota intestinal estuvo ampliamente dominado por bacterias del phylum Firmicutes. Las bacterias del phylum Firmicutes son comúnmente consideradas como miembros de la microbiota autóctona del tracto intestinal de numerosas especies de peces (Roeselers *et al.* 2011, Wu *et al.* 2013, Xing *et al.* 2013). Al respecto, distintas investigaciones han

demostrado la importancia de la presencia Firmicutes en la nutrición de los peces, participando en la absorción de ácidos grasos, la biosíntesis de lípidos y nucleótidos, así como en la digestión de carbohidratos complejos (especialmente polisacáridos) y metabolitos secundarios, por lo que es de esperarse que influyan de manera positiva en el peso corporal del hospedero (Ley *et al.* 2005, Ni *et al.* 2014, Dugas *et al.* 2016, Mekuchi *et al.* 2018, Mikolajczyk *et al.* 2019). Pese a que Firmicutes fue uno de los phyla predominantes en larvas de *C. estor* su abundancia fue relativamente baja, lo cual se vio reflejado posiblemente en una menor tasa de crecimiento de las mismas.

Por otra parte, Planctomycetota (también conocido como Planctomycetes) fue el segundo phylum más dominante en la microbiota de las larvas de *C. estor*, y se ha encontrado entre los phyla más abundantes de la microbiota gastrointestinal del bagre amazónico, *Panaque nigrolineatus* (McDonald *et al.* 2019) y la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Parata *et al.* 2020). Además, se ha reportado que las bacterias pertenecientes a este phylum también se encuentran naturalmente en los sedimentos y cuerpos de agua (Lage *et al.* 2012, Baldo *et al.* 2015, Hermans *et al.* 2017), a la vez que realizan una función importante en la fermentación de los carbohidratos presentes en la dieta (Elshahed *et al.* 2007, Villasante *et al.* 2019). Por lo que la presencia de Planctomycetes en la microbiota intestinal de distintas especies de peces es relativamente común (Parris *et al.* 2016, Nikouli *et al.* 2019, McDonald *et al.* 2019, Patula *et al.* 2021). Sin embargo, la función exacta de estas bacterias en el tracto gastrointestinal de los peces no es totalmente clara, y se asume que podrían vivir de los metabolitos originados por otras bacterias (Rawls *et al.* 2006, Ley *et al.* 2008). Aunque, es probable que estas bacterias jueguen un rol fundamental en el metabolismo de compuestos más complejos (Bengtsson y Øvreås 2010, Wilhelm *et al.* 2019).

Otro de los taxones predominantes en la microbiota de larvas de pez blanco fue Chloroflexi, cuya abundancia se asemeja a la detectada en el tracto intestinal de larvas y juveniles de otras especies de peces de importancia comercial (Ghanbari *et al.* 2017, Lavoie *et al.* 2018, Mekuchi *et al.* 2018, Nikouli *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2020, Patula *et al.* 2021). La presencia de este phylum también ha sido frecuentemente relacionada con el sedimento de diversos ambientes acuáticos, entre ellos las granjas de peces cultivados (van Kessel *et al.* 2011, Wu *et al.* 2012, Ye *et al.* 2014, Li *et al.* 2015), donde podrían llevar a cabo algunas de sus potenciales funciones en el metabolismo de carbohidratos, algunos compuestos nitrogenados, e intervienen en la

biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta (Hug *et al.* 2013, Nierychlo *et al.* 2019). No obstante, la función precisa de Chloroflexi en la microbiota intestinal del hospedero aún se desconoce. La gran abundancia de los phyla Planctomycetes y Chloroflexi identificada en las larvas de *C. estor*, podría ser el reflejo de la incorporación de algunos ingredientes de origen vegetal en las microdietas experimentales, tal como ha sido observado en estudios con larvas de *Danio rerio* (Patula *et al.* 2021).

Por otro lado, las elevadas abundancias de Acidobacteria encontradas en este estudio, igualmente han sido encontradas durante distintos estadios de desarrollo de muchas especies de peces (Roeselers *et al.* 2011, Li *et al.* 2014, Bakke *et al.* 2015, Dehler *et al.* 2017, Mekuchi *et al.* 2018, Mente *et al.* 2018, Nikouli *et al.* 2019). Pese a que su función es imprecisa, se ha inferido que las bacterias de este phylum promueven la degradación, utilización y biosíntesis de polisacáridos estructurales, al tiempo que intervienen en el metabolismo de algunas fuentes de nitrógeno (Rawat *et al.* 2012, Eichorst *et al.* 2018, Domeignoz-Horta *et al.* 2019, Kalam *et al.* 2020). Esto último, sugiere que las Acidobacterias podrían desempeñar un papel importante tanto en el tracto digestivo como en el ambiente de cultivo de las larvas de pez blanco.

En diversos casos, la composición y abundancia de los principales phyla mostrados en la microbiota de las larvas de *C. estor* es diferente de las reportadas en otras especies de peces dulceacuícolas (Ye *et al.* 2014, Escalas *et al.* 2021), y carnívoras (Huyben *et al.* 2018). Estas diferencias mostradas entre las especies de peces analizadas, podrían ser consecuencia (entre otras cosas) de la composición de las diferentes dietas utilizadas, puesto que la dieta se considera como el principal factor que influye en la estructura y composición de las comunidades bacterianas intestinales de los peces, especialmente durante el periodo larvario (Zhou *et al.* 2013, Hartviksen *et al.* 2014, Wang *et al.* 2018, Nikouli *et al.* 2019) y, dichas comunidades a su vez afectan las funciones digestivas y las respuestas inmunitarias de los peces (Bruni *et al.* 2018).

A nivel de género *Nitrosomonas*, *JG30-KF-CM45*, *Providencia*, *Luteitalea* y *Ruminococcus* fueron los taxones predominantes en la microbiota del tracto digestivo de larvas de *C. estor*. Entre ellos, las bacterias del género *Nitrosomonas* tienen una gran relevancia por su capacidad antioxidante que les permite convertir el amoníaco en nitrito (Legrand *et al.* 2018). De forma que su presencia podría evitar la acumulación de amoníaco a niveles tóxicos, sin que el nitrito

llegue a ser perjudicial para los peces en cultivo, al mismo tiempo, proporcionan a otras bacterias un suministro rico en nutrientes para que puedan llevar a cabo diversas funciones (van Kessel *et al.* 2016, Mekuchi *et al.* 2018, Jiang *et al.* 2019, Foosmark *et al.* 2021). La abundancia del género *Providencia* en la microbiota de las larvas de *C. estor* fue notoria y, puede incrementar aún más cuando añadimos individualmente cepas probióticas de *L. acidophilus* y/o prebióticos de pared celular de levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) en las microdietas durante el cultivo larvario de la especie. Aun cuando diversas investigaciones han demostrado que las bacterias del género *Providencia* pueden formar parte del microbiota comensal de algunas especies de peces dulceacuícolas y marinos (Interaminense *et al.* 2010, Ramkumar *et al.* 2014, Tu *et al.* 2014), bajo condiciones específicas tienen la peculiaridad de convertirse en bacterias patógenas oportunistas para los peces cultivados y en el peor de los casos también para el consumidor final (Kurmasheva *et al.* 2018, Ramesh y Souissi 2018, Souza *et al.* 2019). Sin embargo, aunque se desconocen muchas de sus funciones, se sabe que las bacterias de *Providencia* participan en el metabolismo y transporte de aminoácidos, lípidos y carbohidratos (Yuan *et al.* 2020). Si bien, es cierto que las bacterias de *JG30-KF-CM45* suelen ser poco frecuentes en el tracto intestinal de los peces, una abundancia similar a la observada en este estudio fue reportada en juveniles de carpa (*Ctenopharyngodon idellus*) alimentados con dietas formuladas (Yao *et al.* 2019) y, también suelen formar parte de la microbiota gastrointestinal de alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivados con dietas comerciales (Zhang *et al.* 2020). Su función no es completamente conocida pero se asume que *JG30-KF-CM45* son importantes como bacterias desnitrificantes (Han *et al.* 2019). Las bacterias del género *Luteitalea* encontradas en las larvas de *C. estor*, para nuestro conocimiento, es la primera vez que son reportadas en la microbiota del tracto digestivo de los peces, lo que se sabe es que presentan abundancia en todo tipo de sedimentos (incluso acuáticos) y tienen la capacidad de sobrevivir en medios ácidos. Estudios recientes, indican que *Luteitalea* podría llevar a cabo importantes funciones en la degradación de carbohidratos y algunos tipos de aminoácidos (Kalam *et al.* 2020), sin embargo sus funciones aún no son claras. La presencia de *Ruminococcus* ha sido igualmente identificada en larvas de lenguado (*Paralichthys olivaceus*) cultivadas con presas vivas y una dieta formulada (Jiang *et al.* 2019) y, en peces zooplanctófagos silvestres de *Boops boops* (Escalas *et al.* 2021). Además, nuestros hallazgos coinciden con los mostrados en juveniles de corvina (*Nibea coibor*) alimentados con dietas experimentales adicionadas con prebióticos, donde este género fue

encontrado y se asoció con la producción de ácidos grasos de cadena corta como propionato y butirato, relacionados a su vez, con un incremento de distintos parámetros del sistema inmunológico, la capacidad antioxidante y la actividad enzimática digestiva (Li *et al.* 2019). La alta frecuencia de los géneros anteriormente mencionados, podría tener distintas explicaciones, como, que dichos géneros sean comunes en la dieta o en el ambiente, que exista una exclusión competitiva por los recursos disponibles, o bien, que estos taxones puedan ser transmitidos de un individuo a otro (David *et al.* 2014, Bauer *et al.* 2018, Coyte y Rakoff-Nahoum 2019).

La identificación de la microbiota núcleo (core microbiota), definida en los peces como el conjunto de microorganismos globalmente presentes en el intestino y que permanecen estables en el organismo (Mente *et al.* 2018, Kokou *et al.* 2019, Sharpton *et al.* 2021), es uno de los pasos imprescindibles para poder deducir las funciones metabólicas esenciales y/o adaptaciones benéficas realizadas por las bacterias que habitan el tracto intestinal del hospedero (Mueller y Sachs 2015, Macke *et al.* 2017). En el caso de las larvas de *C. estor* su microbiota núcleo se compone por 102 géneros u OTU's, lo cual plantea que la abundancia relativa de este grupo de bacterias no se vio afectada por ninguno de los tratamientos de alimentación ofrecidos a las larvas, a diferencia de la mayoría de los géneros (366 OTU's) identificados en el presente estudio, que si fueron influenciados por la dieta especialmente con la suplementación con pre- y probióticos. La microbiota núcleo de las larvas de pez blanco es amplia en comparación con otras especies de peces (Ye *et al.* 2014, Li *et al.* 2015), sin embargo, existe la posibilidad de que dicha microbiota disminuya a medida que los organismos se adapten a diferentes dietas, niveles tróficos y/o ambientes específicos (Liu *et al.* 2016, Parris *et al.* 2016). Adicionalmente, la microbiota núcleo detectada en el tracto digestivo de las larvas podría ser el resultado de varios procesos fisiológicos (Wiles *et al.* 2016), o bien, porque los microorganismos encontrados confieren efectos funcionales importantes para el hospedero (Sharpton *et al.* 2021). Algunos de los taxones que componen la microbiota núcleo de las larvas de *C. estor*, especialmente del género *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Shewanella*, *Clostridium*, *Pseudomonas* y *Enterococcus* podrían ser aislados e investigados para su uso potencial como cepas probióticas, debido a su capacidad de promover el equilibrio de la microbiota del tracto digestivo, e incrementar la respuesta inmunológica y/o el crecimiento durante las primeras etapas de vida de los peces (Pan *et al.* 2008, Giri *et al.* 2012, Villamil *et al.* 2014, Tapia-Paniagua *et al.* 2014, Xia *et al.* 2019, Waiyamitra *et al.* 2020).

Por otro lado, un intervalo de 7-48 géneros fueron únicos para cada tratamiento de alimentación de larvas de *C. estor*. Esta cantidad de OTU's únicos es semejante a los reportados recientemente por Nikouli y colaboradores (2021) en individuos adultos de cinco especies distintas (*Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, *Diplodus puntazzo*, *Pagrus pagrus* y *Argyrosomus regius*) de peces marinos cultivados. Pero difieren bastante de los 332 OTU's identificados en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en agua dulce, aunque su microbiota núcleo estuvo conformada por tan solo 15 OTU's (Mente *et al.* 2018). La presencia de OTU's únicos entre las comunidades bacterianas que conforman la microbiota de las larvas de *C. estor*, podría implicar que estas bacterias sean transitorias, o bien, que lleven a cabo funciones específicas para cada comunidad de microorganismos (Kokou *et al.* 2019, Zeng *et al.* 2020, Wang y Yang 2021). Sin embargo, es preciso realizar estudios especializados en la función de taxones únicos para corroborar estas hipótesis. Puesto que la microbiota de los peces es dinámica (Giatsis *et al.* 2014, Baldo *et al.* 2015, Zarkasi *et al.* 2016), es probable que los taxones que constituyen la microbiota del tracto digestivo de las larvas de *C. estor*, cambie su conformación según el desarrollo y la edad del pez (Stephens *et al.* 2016, Zhao *et al.* 2020b). Por lo tanto, es fundamental llevar a cabo una investigación integral que nos permita detectar los posibles cambios en la microbiota durante la fase larvaria, juvenil y adulta de esta especie.

Con base en distintos estudios predictivos llevados a cabo mediante las herramientas de PICRUSt (Langille *et al.* 2013), los taxones predominantes identificados en la microbiota del tracto digestivo de las larvas de *C. estor* podrían desempeñar funciones importantes en el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como en la biosíntesis de algunos tipos de aminoácidos, ácidos grasos y vitaminas, al mismo tiempo que promueven la activación del sistema inmunológico y la respuesta contra el estrés provocado durante su cultivo (Xing *et al.* 2013, Mekuchi *et al.* 2018, Villasante *et al.* 2019, Hu *et al.* 2021). Sin embargo, la presencia de microorganismos particulares en el intestino de los peces, no necesariamente implica un papel funcional (Bruni *et al.* 2018). Por lo tanto, es indispensable realizar estudios predictivos que nos permitan identificar las funciones metabólicas potenciales llevadas a cabo por las bacterias que conforman la microbiota de larvas de *C. estor*.

5. Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron un incremento significativo en la supervivencia de las larvas de *C. estor* alimentadas con microdietas suplementadas con cepas

probióticas de *L. acidophilus*, en comparación con el resto de los tratamientos de alimentación. Mientras que la que la suplementación individual del probiótico *L. acidophilus* y/o prebióticos de pared celular de levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) en microdietas para la alimentación de larvas de pez blanco, provocan cambios sustanciales en la microbiota de la especie. Sin embargo, es importante dilucidar si tales cambios en la estructura de la comunidad bacteriana reflejan funciones distintas en el tracto digestivo de las larvas. Mientras que el conocimiento generado sobre la microbiota núcleo de las larvas de *C. estor*, permitirá identificar las comunidades bacterianas intestinales, así como sus genes y/o potenciales funcionales durante las primeras etapas de vida del pez.

6. Referencias

- Abdel-Tawwab M. 2012. **Interactive effects of dietary protein and live bakery yeast, *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fry and their challenge against *Aeromonas hydrophila* infection.** *Aquaculture International* 20: 317-331.
- Al-Dohail, M. A., R. Hashim y M. Aliyu-Paiko. 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.
- AOAC 2000. **Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists.** 17th ed. E.U.A., Washington, DC, 1018 pp.
- Bakke, I., E. Coward, T. Andersen y O. Vadstein. 2015. **Selection in the host structures the microbiota associated with developing cod larvae (*Gadus morhua*).** *Environmental Microbiology* 17 (10): 3914–3924.

- Baldo, L., J. L. Riera, A. Tooming-Klunderud, M. M. Alba y W. Salzburger. 2015. **Gut microbiota dynamics during dietary shift in eastern african cichlid fishes.** *PLoS ONE* 10 (5): e0127462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127462>.
- Banerjee G. y A. K. Ray. 2017. **Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism.** *Symbiosis* 72 (1): 1–11.
- Bauer, M. A., K. Kainz, D. Carmona-Gutiérrez y F. Madeo. 2018. **Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome.** *Microbial Cell* 5 (5): 215-219.
- Beloshapka, A. N., S. E. Dowd, J. S. Suchodolski, J. M. Steiner, L. Duclos y K. S. Swanson. 2013. **Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing.** *FEMS Microbiology Ecology* 84 (3): 532–541.
- Bengtsson M. M. y L. Øvreås. 2010. **Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*.** *BMC Microbiology* 10: 261. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-261>.
- Bradley P. H. y K. S. Pollard. 2017. **Proteobacteria explain significant functional variability in the human gut microbiome.** *Microbiome* 5: 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0244-z>.
- Brown, K., D. DeCoffe, E. Molcan y D. L Gibson. 2012. **Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease.** *Nutrients* 4 (8): 1095–1199.
- Bruni, L., R. Pastorelli, C. Viti, L. Gasco y G. Parisi. 2018. **Characterisation of the intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with *Hermetia illucens***

(black soldier fly) partially defatted larva meal as partial dietary protein source. *Aquaculture* 487: 56-63.

Burr, G., M. Hume, S. Ricke, D. Nisbet y D. Gatlin. 2010. ***In vitro* and *in vivo* evaluation of the prebiotics GroBiotic®-A, inulin, mannanoligosaccharide, and galactooligosaccharide on the digestive microbiota and performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*).** *Microbial Ecology* 59: 187–198.

Callan, C., A. Jordaan y L. J. Kling. 2003. **Reducing *Artemia* use in the culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*).** *Aquaculture* 219 (1-4): 585-595.

Carballo, C., P. I. S. Pinto, A. P. Mateus, C. Berbel, C. C. Guerreiro, J. F. Martínez-Blanch, F. M. Codoñer, L. Mantecon, D. M. Power y M. Manchado. 2019. **Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*).** *Fish and Shellfish Immunology* 92: 31-39.

Carnevali, O., Maradonna, F. y G. Gioacchini. 2017. **Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic.** *Aquaculture* 742: 144-155.

Clements, K. D., E. R. Angert, W. L. Montgomery y J. H. Choat. 2014. **Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not.** *Molecular Ecology* 23 (8): 1891–1898.

Chapagain, P., B. Arivett, B. M. Cleveland, D. M. Walker y M. Salem. 2019. **Analysis of the fecal microbiota of fast- and slow-growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *BMC Genomics* 20: 788. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6175-2>.

- Chen, Y., X. Zhu, Y. Yang, D. Han, J. Jin y S. Xie. 2014. **Effect of dietary chitosan on growth performance, haematology, immune response, intestine morphology, intestine microbiota and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)**. *Aquaculture Nutrition* 20 (5): 532–546.
- Conceição, L. E. C., M. Yúfera, P. Makridis, S. Morais y M. T. Dinis. 2010. **Live feeds for early stages of fish rearing**. *Aquaculture Research* 41 (5): 613–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x>.
- Conway, J. R., A. Lex y N. Gehlenborg. 2017. **UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties**. *Bioinformatics* 33 (18): 2938-2940.
- Coyte K. Z. y S. Rakoff-Nahoum. 2019. **Understanding competition and cooperation within the mammalian gut microbiome**. *Current Biology* 29 (11): R538–R544.
- David, L. A., C. F. Maurice, R. N. Carmody, D. B. Gootenberg, J. E. Button, B. E., Wolfe, A. V. Ling, A. S. Devlin, Y. Varma, M. A. Fischbach, S. B. Biddinger, R. J. Dutton, R. J. y P. J. Turnbaugh. 2014. **Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome**. *Nature* 505: 559–563.
- Dawood M. A. O. y S. Koshio. 2016. **Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review**. *Aquaculture* 454: 243-251.
- Dawood, M. A. O., S. Koshio, M. Ishikawa, M. El-Sabagh, M. A. Esteban y A. L. Zaineldin. 2016. **Probiotics as an environment-friendly approach to enhance red sea bream, *Pagrus major* growth, immune response and oxidative status**. *Fish & Shellfish Immunology* 57: 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.038>.

- Dawood, M. A. O., S. Koshio, M. M. Abdel-Daim y H. Van-Doan. 2019. **Probiotic application for sustainable aquaculture.** *Reviews in Aquaculture* 11 (3): 907-924.
- Dawood, M. A. O., S. Koshio, M. Ishikawa y S. Yokoyama. 2015. **Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of Amberjack, *Seriola dumerili* juveniles.** *BioMed Research International* 514196. <https://doi.org/10.1155/2015/514196>.
- Dhanaraj, M., M. A. Haniffa, S. A. Singh, A. J. Arockiaraj, C. M. Ramakrishanan, S. Seetharaman y R. Arthimanju. 2010. **Effect of probiotics on growth performance of koi carp (*Cyprinus carpio*).** *Journal of Applied Aquaculture* 22 (3): 202–209.
- Dehler, C. E., C. J. Secombes y S. Martin. 2017. **Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.).** *Aquaculture* 467: 149–157.
- Domeignoz-Horta, L. A., K. M. DeAngelis y G. Pold. 2019. **Draft genome sequence of Acidobacteria group 1 *Acidipila* sp. strain EB88, isolated from forest soil.** *Microbiology Resource Announcements* 8 (1): e1464-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01464-18>.
- Dugas, L. R., M. Fuller, J. Gilbert y B. T. Layden. 2016. **The obese gut microbiome across the epidemiologic transition.** *Emerging Themes in Epidemiology* 13 (2): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12982-015-0044-5>.
- Ebeling M. E. 1968. **The Dumas Method for Nitrogen in Feeds.** *Journal of AOAC International* 51 (4): 766-770. <https://doi.org/10.1093/jaoac/51.4.766>.

- Ebrahimi, G., H. Ouraji, M. K. Khalesi, M. Sudagar, A. Barari, M. Zarei-Dangesaraki y K. H. Jani-Khalili. 2012. **Effects of a prebiotic, Immunogen[®], on feed utilization, body composition, immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings.** *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96 (4): 591–599.
- Eichorst, S. A., D. Trojan, S. Roux, C. Herbold, T. Rattei y D. Woebken. 2018. **Genomic insights into the *Acidobacteria* reveal strategies for their success in terrestrial environments.** *Environmental Microbiology* 20 (3): 1041–1063.
- El-Rahman, A. M., Y. A. E. Khattab y A. M. E. Shalaby. 2009. ***Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *Fish & Shellfish Immunology* 27 (2): 175–180.
- Elshahed, M. S., N. H. Youssef, Q. Luo, F. Z. Najar, B. A. Roe, T. M. Sisk, S. I. Bühring, K. U. Hinrichs y L. R. Krumholz. 2007. **Phylogenetic and metabolic diversity of *Planctomycetes* from anaerobic, sulfide-and sulfur-rich Zodletone Spring, Oklahoma.** *Applied and Environmental Microbiology* 73 (15): 4707–4716.
- Escalas, A., J. -C. Auguet, A. Avouac, R. Seguin, A. Gradel, L. Borrossi y S. Villéger. 2021. **Ecological specialization within a carnivorous fish family is supported by a herbivorous microbiome shaped by a combination of gut traits and specific diet.** *Frontiers in Marine Science* 8: 622883. [https://doi: 10.3389/fmars.2021.622883](https://doi.org/10.3389/fmars.2021.622883).
- FAO. 2018. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible.** Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO. 2020. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción.** Roma, Italia. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.

Faramarzi, M, S. Kiaalvandi, M. Lashkarbolooki y F. Iranshahi. 2011. **The investigation of *Lactobacillus acidophilus* as probiotics on growth performance and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 6 (1): 32-38.

Foosmark, R. O., K. J. K. Attramadal, K. Nordøy, S. W. Østerhus y O. Vadstein. 2021. **A comparison of two seawater adaptation strategies for Atlantic salmon post-smolt (*Salmo salar*) grown in recirculating aquaculture systems (RAS): Nitrification, water and gut microbiota, and performance of fish.** *Aquaculture* 532: 735973. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735973>.

Ganguly S. y A. Prasad. 2012. **Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism.** *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22 (1): 11–16.

Garcia-Mazcorro, J. F., J. R. Barcenas-Walls, J. S. Suchodolski y J. M. Steiner. 2017. **Molecular assessment of the fecal microbiota in healthy cats and dogs before and during supplementation with fructo-oligosaccharides (FOS) and inulin using high-throughput 454-pyrosequencing.** *PeerJ* 5: e3184. <https://doi.org/10.7717/peerj.3184>.

Garlock, T., F. Asche, J. Anderson, T. Bjørndal, G. Kumar, K. Lorenzen, A. Ropicki, M. D. Smith y R. Tveterås. 2019. **A Global Blue Revolution: Aquaculture growth across regions, species, and countries.** *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 1: 107-116.

Ghanbari, M., W. Kneifel y K. J. Domig. 2015. **A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing.** *Aquaculture* 448: 464–475.

- Ghanbari, M., H. Shahraki, W. Kneifel y K. J. Domig. 2017. **A first insight into the intestinal microbiota of snow trout (*Schizothorax zarudnyi*)**. *Symbiosis* 72: 183-193.
- Gibson, G. R., R. Hutkins, M. E. Sanders, S. L. Prescott, R. A. Reimer, S. J. Salminen, K. Scott, C. Stanton, K. S. Swanson, P. D. Cani, K. Verbeke y G. Reid. 2017. **The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics**. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14: 491–502.
- Giatsis, C., D. Sipkema, H. Smidt, J. Verreth y M. Verdegem. 2014. **The colonisation dynamics of the gut microbiota in tilapia larvae**. *PLoS ONE* 7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103641>.
- Giri, S. S., S. S. Sen y V. Sukumaran. 2012. **Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita***. *Fish & Shellfish Immunology* 32 (6): 1135–1140.
- Gómez-Gil, B., K. Enciso, L. E. Cruz-Suárez y C. Hernández. 2017. **Efecto de la dieta en el microbioma intestinal de organismos acuáticos**. *En*: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M. G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., López Acuña, L. M. y Galaviz-Espinoza, M. (eds). **Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuicola Universidad Autónoma de Nuevo León**. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 570-581. ISBN 978-607-27-0822-8.
- Gopalakannan A. y V. Arul. 2010. **Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of b-glucan and whole cell yeast**. *Aquaculture Research* 41 (6): 884-892.

- Gonçalves A. T. y C. Gallardo-Escárate. 2017. **Microbiome dynamic modulation through functional diets based on pre- and probiotics (mannan-oligosaccharides and *Saccharomyces cerevisiae*) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Journal of Applied Microbiology* 122 (5): 1333-1347.
- González-Félix, M. L., D. M. Gatlin III, P. Urquidez-Bejarano, C. de la Reé-Rodríguez, L. Duarte-Rodríguez, F. Sánchez, A. Casas-Reyes, F. Y. Yamamoto, A. Ochoa-Leyva y M. Pérez-Velazquez. 2018. **Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*.** *Aquaculture* 491: 239-251.
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A. y Enes, P. 2018. **Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture.** *Reviews in Aquaculture*, 10: 800-832.
- Gültepe, N., O. Hisar, S. Salnur, B. Hoşsu, T. T. Tanrikul y S. Aydin. 2012. **Preliminary assessment of dietary mannanoligosaccharides on growth performance and health status of gilthead seabream *Sparus auratus*.** *Journal of Aquatic Animal Health* 24: 37-42.
- Hai N. V. 2015. **The use of probiotics in aquaculture.** *Journal of Applied Microbiology* 119 (4): 917-935.
- Hamre, K., M. Yúfera, I. Rønnestad, C. Boglione, L. E. C. Conceição y M. Izquierdo. 2013. **Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing.** *Reviews in Aquaculture* 5 (s1): S26-S58. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01086.x>.

- Han, Z., D. Zeng, Z. Mou, G. Shi, Y. Zhang y Z. Lou. 2019. **A novel spatiotemporally anaerobic/semi-aerobic bioreactor for domestic solid waste treatment in rural areas.** *Waste Management* 86: 97-105.
- Hansen, Ø. J., V. Puvanendran, J. P. Jøstensen y I. B. Falk-Petersen. 2018. **Early introduction of an inert diet and unenriched *Artemia* enhances growth and quality of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae.** *Aquaculture Nutrition* 24 (1): 102–111. <https://doi.org/10.1111/anu.12538>.
- Hartviksen, M. B., J. L. G. Vecino, E. Ringø, A. –M. Bakke, S. Wadsworth, Å. Krogdahl, K. Ruohonen y A. Kettunen. 2014. **Alternative dietary protein sources for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) effect on intestinal microbiota, intestinal and liver histology and growth.** *Aquaculture Nutrition* 20 (4): 381–398.
- Hauville M. R., J. L. Zambonino-Infante, G. Bell, H. Migaud y K. L. Main. 2014. **Impacts of three different microdiets on Florida pompano, *Trachinotus carolinus*, weaning success, growth, fatty acid incorporation and enzyme activity.** *Aquaculture* 422–423: 268–276.
- Hermans, S. M., H. L. Buckley, B. S. Case, F. Curran-Cournane, M. Taylor y G. Lear. 2017. **Bacteria as emerging indicators of soil condition.** *Applied and Environmental Microbiology* 83 (1): e02826–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02826-16>.
- Hooper, L. V., D. R. Littman y A. J. Macpherson. 2012. **Interactions between the microbiota and the immune system.** *Science* 336 (6086): 1268–1273.
- Hoseinifar, S. H., M. Khalili, H. K. Rostami y M. A. Esteban. 2013. **Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry.** *Fish & Shellfish Immunology* 35 (5): 1416-1420.

- Hoseinifar, S. H., Z. Roosta, A. Hajimoradloo y F. Vakili. 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.
- Hu, Z., Q. Tong, J. Chang, J. Yu, S. Li, H. Niu y D. Ma. 2021. **Gut bacterial communities in the freshwater snail *Planorbella trivolvis* and their modification by a non-herbivorous diet.** *PeerJ* 9: e10716. <https://doi.org/10.7717/peerj.10716>.
- Huang, S., S. Vieira, B. Bunk, T. Riedel, C. Spröer y J. Overmann. 2016. **First complete genome sequence of a subdivision 6 *Acidobacterium* strain.** *Genome Announcements* 4 (3): e00469-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00469-16>.
- Huber K. J. y J. Overmann. 2018. ***Vicinamibacteraceae* fam. nov., the first described family within the subdivision 6 *Acidobacteria*.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68: 2331–2334.
- Hug, L. A., C. J. Castelle, K. C. Wrighton, B. C. Thomas, I. Sharon, K. R. Frischkom, K. H. Williams, S. G. Tringe y J. F. Banfield. 2013. **Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling.** *Microbiome* 1: 22. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-22>.
- Hughes, L. C., G. M. Somoza, B. N. Nguyen, J. P. Bernot, M. González-Castro, J. M. Díaz de Astarloa y G. Ortí. 2017. **Transcriptomic differentiation underlying marine-to-freshwater transitions in the South American silversides *Odontesthes argentinensis* and *O. bonariensis* (Atheriniformes).** *Ecology and Evolution* 7 (14): 5258-5268.

- Huyben, D., L. Sun, R. Moccia, A. Kiessling, J. Dicksved y T. Lundh. 2018. **Dietary live yeast and increased water temperature influence the gut microbiota of rainbow trout.** *Journal of Applied Microbiology* 124 (6): 1377-1392.
- Ingerslev, H. C., L. Jorgensen, M. L. v. G., Strube, N. Larsen, I. Dalsgaard, M. Boye y L. Madsen. 2014. **The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type.** *Aquaculture* 425-425: 24–34.
- Interaminense, J. A., D. C. O. Nascimento, R. F. Ventura, J. E. C. Batista, M. M C. Souza, F. H. V. Hazin, N. T. Pontes-Filho y J. V. Lima-Filho. 2010. **Recovery and screening for antibiotic susceptibility of potential bacterial pathogens from the oral cavity of shark species involved in attacks on humans in Recife, Brazil.** *Journal of Medical Microbiology* 59 (8): 941–947.
- Jatobá, A., F. N. Vieira, C. C. Buglione-Neto, J. L. P. Mouriño', B. C. Silva, W. Q. Seiffter y E. R. Andreatta. 2011. **Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp.** *Fish Physiology and Biochemistry* 37: 725-732.
- Jiang, Y., Z. Liu, X. Liu, Y. Xu, B. Shi y B. Wang. 2019. **Structural characteristics and succession of intestinal microbiota for *Paralichthys olivaceus* during the early life stage.** *Aquaculture Research* 50 (2): 529-540.
- Kalam, S., A. Basu, I. Ahmad, R. Z. Sayyed, H. A. El-Enshasy, D. J. Dailin y N. L. Suriani. 2020. **Recent understanding of soil Acidobacteria and their ecological significance: A critical review.** *Frontiers in Microbiology* 11: 580024. <https://doi/10.3389/fmicb.2020.580024>.

- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M. J. Lategan y L. Gibson. 2008. **Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes.** *Aquaculture* 274 (1): 1-14.
- Kokou, F., G. Sasson, J. Friedman, S. Eyal, O. Ovadia, S. Harpaz, A. Cnaani y I. Mizrahi. 2019. **Core gut microbial communities are maintained by beneficial interactions and strain variability in fish.** *Nature Microbiology* 4: 2456–2465.
- Kurmasheva, N., V. Vorobiev, M. Sharipova, T. Efremova y A. Mardanova. 2018. **The potential virulence factors of *Providencia stuartii*: motility, adherence, and invasion.** *Biomed Research International* 3589135. <https://doi.org/10.1155/2018/3589135>.
- Lage, O. M., J. Bondoso y F. Viana. 2012. **Isolation and characterization of Planctomycetes from the sediments of a fish farm wastewater treatment tank.** *Archives of Microbiology* 194: 879–885.
- Lara-Flores, M., L. Olivera-Castillo y M. A. Olvera-Novoa. 2010. **Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 2 (4): 93-101.
- Larsen, A. M., H. H. Mohammed y C. R. Arias. 2014. **Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warm water fish species.** *Journal of Applied Microbiology* 116 (6): 1396-1404.
- Langille, M. G., J. Zaneveld, J. G. Caporaso, D. McDonald, D. Knights, J. A. Reyes, J. C. Clemente, D. E. Burkpile, R. L. V. Thurber, R. Knight, R. G. Beiko y C. Huttenhower. 2013. **Predictive**

functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences.
Nature Biotechnology 31 (9): 814-821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>.

Lavoie, C., M. Courcelle, B. Redivo y N. Derome. 2018. **Structural and compositional mismatch between captive and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) parrs' gut microbiota highlights the relevance of integrating molecular ecology for management and conservation methods.** *Evolutionary Applications* 11 (9): 1671-1685.

Le, D., P. Nguyen, D. Nguyen, K. Dierckens, N. Boon, T. Lacoere, F. –M. Kerckhof, J. De Vrieze, O. Vadstein y P. Bossier. 2020. **Gut microbiota of migrating wild rabbit fish (*Siganus guttatus*) larvae have low spatial and temporal variability.** *Microbial Ecology* 79: 539–551.

Legrand, T. P. R. A., S. R. Catalano, M. L. Wos-Oxley, F. Stephens, M. Landos, M. S. Bansemer, D. A. J. Stone, J. G. Qin y A. P. A. Oxley. 2018. **The inner workings of the outer surface: skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in yellowtail kingfish.** *Frontiers in Microbiology* 8: 2664. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02664>.

Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight y J. I. Gordon. 2005. **Obesity alters gut microbial ecology.** *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 102 (31): 11070–11075.

Ley, R. E., M. Hamady, C. Lozupone, P. J. Turnbaugh, R. R. Ramey, J. S. Bircher, M. L. Schlegel, T. A. Tucker, M. D. Schrenzel, R. Knigth y J. I. Gordon. 2008. **Evolution of mammals and their gut microbes.** *Science* 320 (5883): 1647–1651.

Li, T., M. Long, F. J. Gatesoupe, Q. Zhang, A. Li y X. Gong. 2014. **Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing.** *Microbiology of Aquatic Systems* 69: 25-36.

- Li, Z., N. T. Tran, P. Ji, Z. Sun, X. Wen y S. Li. 2019. **Effects of prebiotic mixtures on growth performance, intestinal microbiota and immune response in juvenile chu's croaker, *Nibea coibor***. *Fish and Shellfish Immunology* 89: 564-573.
- Li, X., Q. Yan, S. Xie, W. Hu, Y. Yu y Z. Hu. 2013. **Gut microbiota contributes to the growth of fast-growing transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.)**. *PLoS ONE* 8 (5): e64577. <https://doi:10.1371/journal.pone.0064577>.
- Li, X., Y. Yu, W. Feng, Q. Yan y Y. Gong. 2012. **Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae**. *The Journal of Microbiology* 50 (1): 29-37.
- Li, H., Q. Zhong, S. Wirth, W. Wang, Y. Hao, S. Wu, H. Zou, W. Li y G. Wang. 2015. **Diversity of autochthonous bacterial communities in the intestinal mucosa of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Valenciennes) determined by culture-dependent and culture independent techniques**. *Aquaculture Research* 46 (10): 2344–2359.
- Liu, H., X. Guo, R. Gooneratne, R. Lai, C. Zeng, F. Zhang y W. Wang. 2016. **The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels**. *Scientific Reports* 6: 24340. <https://doi.org/10.1038/srep24340>.
- Llewellyn, M. S., S. Boutin, S. H. Hoseinifar y N. Derome. 2014. **Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries**. *Frontiers in Microbiology* 5: 207. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207>.
- Macke, E., A. Tasiemski, F. Massol, M. Callens y E. Decaestecker. 2017. **Life history and eco-evolutionary dynamics in light of the gut microbiota**. *Oikos* 126 (4): 508–531.

- Mansour, M. R., R. Akrami, S. H. Ghobadi, K. A. Denji, N. Ezatrahimi y A. Gharaei. 2012. **Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754).** *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 829–835.
- Martin S. A. M. y E. Król. 2017. **Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies.** *Developmental and Comparative Immunology* 75: 86-98.
- Martínez-Angeles E. 2016. **Uso de microagregados como primer alimento en larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*).** Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 80 pp.
- Martínez-Chávez, C. C., A. Tello-Ballinas, J. Fonseca-Madriral, L. G. Ross y C. A. Martínez-Palacios. 2014. **Photoperiodic growth enhancement in a tropical batch spawning atherinopsid, pike silverside *Chirostoma estor*.** *Journal of Fish Biology* 85: 546-553. <https://doi.org/10.1111/jfb.12442>.
- Martínez-Palacios, C. A., M. G. Ríos Durán, J. Fonseca-Madriral, E. M. Toledo-Cuevas, A. Sotelo-López y L. G. Ross. 2008. **Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880.** *Aquaculture Research* 39 (7): 738–747. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01926.x>.
- Martins, G., P. Diogo, W. Pinto y P. J. Gavaia. 2018. **Early transition to microdiets improves growth, reproductive performance and reduces skeletal anomalies in zebrafish (*Danio rerio*).** *Zebrafish* 16 (3): 1-8. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1691>.
- Mekuchi, M., T. Asakura, K. Sakata, T. Yamaguchi, K. Teruya y J. Kikuchi. 2018. **Intestinal microbiota composition is altered according to nutritional biorhythms in the leopard coral**

grouper (*Plectropomus leopardus*). *PLoS ONE* 13 (6): e0197256.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197256>.

Mente, E., E. Nikouli, E. Antonopoulou, S. A. M. Martin y K. A. Kormas. 2018. **Core vs. diet-associated and postprandial bacterial communities of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) midgut and faeces.** *Biology Open* 7 (6): bio.034397.
<https://doi.org/10.1242/bio.034397>.

Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. Baker, J. M. Bogwald, M. Castex y E. Ringø. 2010. **The current status and future focus of probiotic and prebiotic application for salmonids.** *Aquaculture* 302 (1-2): 1-18.

McDonald, R. C., J. E. M. Watts y H. J. Schreier. 2019. **Effect of diet on the enteric microbiome of the wood-eating catfish *Panaque nigrolineatus*.** *Frontiers in Microbiology* 10: 2687.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02687>.

Michel, C., C. Pelletier, M. Boussaha, D.-G. Douet, A. Lautraite y P. Tailliez. 2007. **Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis.** *Applied and Environmental Microbiology* 73 (9): 2947-2955.

Middelbos, I. S., B. M. Vester Boler, A. Qu, B. A. White, K. S. Swanson y G. C. Fahey. 2010. **Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing.** *PLoS ONE* 5: e9768.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>.

Mikolajczyk R. y L. M. Roesner. 2019. **General aspects regarding the skin microbiome.** *Hautarzt* 70 (6): 400–406.

- Miyake, S., D. K. Ngugi y U. Stingl. 2015. **Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes.** *Molecular Ecology* 24 (3): 656–672.
- Mohan, K., S. Ravichandran, T. Muralisankar, V. Uthayakumar, R. Chandirasekar, P. Seedevis y D. K. Rajan. 2019. **Potential uses of fungal polysaccharides as immunostimulants in fish and shrimp aquaculture: A review.** *Aquaculture* 500: 250-263.
- Monroig, Ó., D. R. Tocher y J. C. Navarro. 2013. **Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms.** *Marine Drugs* 11 (10): 3998–4018.
- Mueller U. G. y J. L. Sachs. 2015. **Engineering microbiomes to improve plant and animal health.** *Trends in Microbiology* 23 (10): 606–617.
- Muzinic, L. A., K. R. Thompson, A. Morris, C. D. Webster, D. B. Rouse y L. Manomaitis. 2004. **Partial and total replacement of fishmeal with soybean meal and brewer's gains with yeast in practical diets for Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*).** *Aquaculture* 230 (1-4): 359-376.
- Nayak S. K. 2010a. **Probiotic and immunity: A fish perspective.** *Fish & Shellfish Immunology* 29 (1): 2-14.
- Nayak S. K. 2010b. **Role of gastrointestinal microbiota in fish.** *Aquaculture Research* 41 (11): 1553–1573.

- Nelson, T. M., T. L. Rogers, A. R. Carlini y M. V. Brown. 2013. **Diet and phylogeny shape the microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals.** *Environmental Microbiology* 15 (4): 1132–1145.
- Ni, J., Q. Yan, Y. Yu y T. Zhang. 2014. **Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism.** *FEMS Microbiology Ecology* 87 (3): 704-714.
- Nikouli, E., A. Metziti, E. Antonopoulou, E. Mente y K. A. Kormas. 2019. **Host-associated bacterial succession during the early embryonic stages and first feeding in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*).** *Genes* 10 (7): 483. <https://doi.org/10.3390/genes10070483>.
- Nikouli, E., A. Metziti, E. Smeti, E. Antonopoulou, E. Mente y K. A. Kormas. 2021. **Gut microbiota of five sympatrically farmed marine fish species in the Aegean Sea.** *Microbial Ecology* 81: 460–470.
- Nierychlo, M., A. Miłobędzka, F. Petriglieri, B. McIlroy, P. H. Nielsen y S. J. McIlroy. 2019. **The morphology and metabolic potential of the Chloroflexi in full-scale activated sludge wastewater treatment plants.** *FEMS Microbiology Ecology* 95 (2): fiy228. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy228>.
- Olafsen J. A. 2001. **Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture.** *Aquaculture* 200 (1-2): 223-247.
- Ortuño, J., A. Cuesta, A. Rodríguez, M. A. Esteban y J. Meseguer. 2002. **Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.).** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 85 (1-2): 41–50.

- Ou, W., H. Hu, P. Yang, J. Dai, Q. Ai, W. Zhang, Y. Zhang y K. Mai. 2019. **Dietary daidzein improved intestinal health of juvenile turbot in terms of intestinal mucosal barrier function and intestinal microbiota.** *Fish & Shellfish Immunology* 94: 132-141.
- Øverland M. y A. Skrede. 2016. **Yeast derived from lignocellulosic biomass as a sustainable feed resource for use in aquaculture.** *Science of Food and Agriculture* 97 (3): 733-742.
- Pan, X., T. Wu, Z. Song, H. Tang y Z. Zhao. 2008. **Immune responses and enhanced disease resistance in Chinese Drum, *Miichthys miiuy* (Basilewsky), after oral administration of live or dead cells of *Clostridium butyrium* CB2.** *Journal of Fish Diseases* 31 (9): 679–686.
- Parata, L., D. Mazumder, J. Sammut y S. Egan. 2020. **Diet type influences the gut microbiome and nutrient assimilation of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *PLoS ONE* 15 (8): e0237775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237775>.
- Parris, D. J., R. M. Brooker, M. A. Morgan, D. L. Dixon y F. J. Stewart. 2016. **Whole gut microbiome composition of damselfish and cardinalfish before and after reef settlement.** *PeerJ* 4: e2412. <https://doi.org/10.7717/peerj.2412>.
- Patula, S., M. Wojno, L. J. Pinnell, F. Oliaro, C. Cabay, G. S. Molinari y K. Kwasek. 2021. **Nutritional Programming with Dietary Soybean Meal and Its Effect on Gut Microbiota in Zebrafish (*Danio rerio*).** *Zebrafish* 18 (2): 125-138.
- Pedroza-Islas, R., P. Gallardo, E. L. Vernon-Carter, T. García-Galano, C. Rosas, C. Pascual y G. Gaxiola. 2004. **Growth, survival, quality and digestive enzyme activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets.** *Aquaculture Nutrition* 10 (3): 167-173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00284.x>.

- Pereira F. C. y D. Berry. 2017. **Microbial nutrient niches in the gut.** *Environmental Microbiology* 19 (4): 1366–1378.
- Pintado, J., M. Pérez-Lorenzo, A. Luna-González, C. G. Sotelo, M. J. Prol y M. Planas. 2010. **Monitoring of the bioencapsulation of a probiotic Phaeobacter strain in the rotifer *Brachionus plicatilis* using denaturing gradient gel electrophoresis.** *Aquaculture* 302 (3-4): 182-194.
- Pirarat, N., K. Pinpimai, C. Rodkhum, N. Chansue, E. L. Ooi, T. Katagiri y M. Maita. 2015. **Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against *Streptococcus agalactiae*.** *Animal Feed Science and Technology* 207: 93–103.
- Radhakrishnan, D. K., I. AkbarAli, B. V. Schmidt, E. M. John, S. Sivanpillai y S. T. Vasunambesan. **Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview.** *Aquaculture Research* 51 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1111/are.14357>.
- Ramos, M. A., J. F. Weber Goncalves, G. A. Santos, P. Rema y R. O. A. Ozório. 2013. **Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 166 (2): 302–307.
- Ramesh D. y S. Souissi. 2018. **Antibiotic resistance and virulence traits of bacterial pathogens from infected freshwater fish, *Labeo rohita*.** *Microbial Pathogenesis* 116: 113-119.

- Ramkumar, R., M. Ravi, C. Jayaseelan, A. A. Rahuman, M. Anandhi, C. Rajthilak y P. Perumal. 2014. **Description of *Providencia vermicola* isolated from diseased Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822).** *Aquaculture* 420-421: 193-197.
- Rawat, S. R., M. K. Männistö, Y. Bromberg y M. M. Häggblom. 2012. **Comparative genomic and physiological analysis provides insights into the role of *Acidobacteria* in organic carbon utilization in Arctic tundra soils.** *FEMS Microbiology Ecology* 82 (2): 341–355.
- Rawls, J. F., M. A. Mahowald, R. E. Ley y J. I. Gordon. 2006. **Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection.** *Cell* 127 (2): 423–433.
- Ringø, E., S. H. Hoseinifar, K. Ghosh, H. V. Doan, B. R. Beck y S. K. Song. 2018. **Lactic Acid Bacteria in Finfish-An Update.** *Frontiers in Microbiology* 9: 1818. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>.
- Rønnestad, I., C. R. Rojas-García, S. K. Tonheim y L. E. C. Conceição. 2001. **In vivo studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larvae.** *Aquaculture* 201 (1-2): 161–175.
- Roeselers, G., E. K. Mittge, W. Z. Stephens, D. M. Parichy, C. M. Cavanaugh, K. Guillemin y J. F. Rawls. 2011. **Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish.** *The ISME Journal* 5: 1595–1608.
- Rolig, A. S., R. Parthasarathy, A. R. Burns, B. J. M. Bohannan y K. Guillemin. 2015. **Individual members of the microbiota disproportionately modulate host innate immune responses.** *Cell Host & Microbe* 18 (5): 613–620.

- Sáenz de Rodrigáñez, M. A., P. Díaz-Rosales, M. Chabrilón, H. Smidt, S. Arijó, J. M. León-Rubio, F. J. Alarcón, M. C. Balebona, M. A. Moriñigo, J. B. Cara y F. J. Moyano. 2009. **Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858).** *Aquaculture Nutrition* 15 (2): 177- 185.
- Selvaraj, V., K. Sampath y V. Sekar. 2005. **Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*.** *Fish & Shellfish Immunology* 19 (4): 293-306.
- Sharpton, T. J., K. Stagaman, M. J. Sieler, H. K. Jr. Arnold y E. W. Davis II. 2021. **Phylogenetic integration reveals the zebrafish core microbiome and its sensitivity to environmental exposures.** *Toxics* 9 (1): 10. <https://doi.org/10.3390/toxics9010010>.
- Smriga, S., S. A. Sandin y F. Azam. 2010. **Abundance diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces.** *FEMS Microbiology Ecology* 73 (1): 31–42.
- Son, V. M., C. C. Chang, M. C. Ju, Y. K. Guu, C. H. Chiu y W. Cheng. 2009. **Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*.** *Fish & Shellfish Immunology* 26 (5): 691-698.
- Souza, C. F., M. D. Baldissera, C. M. Verdi, R. C. V. Santos, M. I. U. M. Da Rocha, M. L. da Veiga, A. S. da Silva y B. Baldisserotto. 2019. **Oxidative stress and antioxidant responses in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* experimentally infected by *Providencia rettgeri*.** *Microbial Pathogenesis* 131: 164-169.

Stephens, W. Z., A. R. Burns, K. Stagaman, S. Wong, J. F. Rawls, K. Guillemin y B. J. M. Bohannan. 2016. **The composition of the Zebrafish intestinal microbial community varies across development.** *The ISME Journal* 10 (3): 644–654.

Subasinghe R. P. 2005. **Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture.** *Preventive Veterinary Medicine* 67 (2-3): 117–124.

Sullam, K. E., S. D. Essinger, C. A. Lozupone, M. P. O'Connor, G. L. Rosen, R. Knight, S. S. Kilham y J. A. Russell. 2012. **Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis.** *Molecular Ecology* 21 (13): 3363–3378.

Swanson, K. S., S. E. Dowd, J. S. Suchodolski, I. S., Middelbos, B. M. Vester, K. A. Barry, E. K. Nelson, M. Torralba, B. Henrissat, P. M. Coutinho, I. K. Isaac KO Cann, B. A. White y C. F. George. 2011. **Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice.** *The ISME Journal* 5: 639–649.

Takeuchi T., Q. Wang, H. Furuita, T. S. Hirota, S. Ishida y H. Hayasawa. 2003. **Development of Microparticle Diets for Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* Larvae.** *Fisheries Science* 69 (3): 547-554.

Tapia-Paniagua, S., C. Lobo, X. Moreno-Ventas, I. G. de la Banda, M. A. Morigiño, M. C. Balebona. 2014. **Probiotic supplementation influences the diversity of the intestinal microbiota during early stages of farmed senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858).** *Marine Biotechnology* 16: 716-728.

Tarnecki, A. M., F. A. Burgos, C. L. Ray y C. R. Arias. 2017. **Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics.** *Journal of Applied Microbiology* 123 (1): 2–17.

- Tarnecki, A. M., M. Wafapoor, R. N. Phillips y N. R. Rhody. 2019. **Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance.** *Scientific Reports* 9: 4892. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39316-w>.
- Torrecillas, S., A. Makol, M. J. Caballero, D. Montero, L. Robaina, F. Real, J. Sweetman, L. Tort y M. Izquierdo. 2007. **Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannanoligosaccharides.** *Fish & Shellfish Immunology* 23 (5): 969-981.
- Torrecillas, S., D. Montero y M. Izquierdo. 2014. **Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: potential mode of action.** *Fish & Shellfish Immunology* 36 (2): 525–544.
- Tovar-Ramírez, D., D. Mazurais, J. F. Gatesoupe, P. Quazuguel, C. L. Cahu y J. L. Zambonino-Infante. 2010. **Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae.** *Aquaculture* 300 (1): 142-147.
- Tran, N. T., F. Xiong, Y. T. Hao, J. Zhang, S. G. Wu y G. T. Wang. 2017. **Two biomass preparation methods provide insights into studying microbial communities of intestinal mucosa in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*).** *Aquaculture Research* 48 (8): 4272–4283.
- Tu, N., Q. Tu., H. Tung, D. Hieu y S. Romero-Jovel. 2014. **Detection of tetrodotoxin-producing *Providencia rettgeri* T892 in *Lagocephalus pufferfish*.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30: 1829–1835.
- Tuan, T. N., P. M. Duc y K. Hatai. 2013. **Overview of the use of probiotics in aquaculture.** *International Journal Research of Fish Aquaculture* 3 (3): 89-97.

- Tyagi, A., B. Singh, N. K. Billekallu-Thammegowda y N. K. Singh. 2019. **Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome.** *Archives of Microbiology* 201: 295–303.
- van Kessel, M. A. H. J., B. E. Dutilh, K. Neveling, M. P. Kwint, J. A. Veltman, G. Flik, M. S. Jetten, P. H. M. Klaren y H. J. M. O. den Camp. 2011. **Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.).** *AMB Express* 1: 41.
- van Kessel, M. A. H. J., R. J. Mesman, A. Arshad, J. R. Metz, F. A. T. Spanings, S. C. M. van Dalen, L. van Niftrik, G. Flik, S. E. W Bonga, M. S. M. Jetten, P. H. M. Klaren y H. J. M. O. den Camp. 2016. **Branchial nitrogen cycle symbionts can remove ammonia in fish gills.** *Environmental Microbiology Reports* 8 (5): 590-594.
- Vandenplas, Y., I. Zakharova y Y. Dmitrieva. 2015. **Oligosaccharides in infant formula: more evidence to validate the role of prebiotics.** *British Journal of Nutrition* 113 (9): 1339-1344.
- Vázquez-Silva, G., H. C. Ramírez-Saad, J. F. Aguirre-Garrido, L. Mayorga-Reyes, A. Azaola-Espinosa y J. Morales-Jiménez. 2017. **Effect of bacterial probiotics bio-encapsulated into *Artemia franciscana* on weight and length of the shortfin silverside (*Chirostoma humboldtianum*), and PCR-DGGE characterization of its intestinal bacterial community.** *Latin American Journal of Aquatic Research* 45 (5): 1031-1043.
- Vieira, S., M. Luckner, G. Wanner y J. Overmann. 2017. ***Luteitalea pratensis* gen. nov., sp. nov. a new member of subdivision 6 *Acidobacteria* isolated from temperate grassland soil.** *International of Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 1408–1414.

- Villamil, L., C. Reyes y M. A. Martínez-Silva. 2014. ***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.
- Villasante, A., C. Ramírez, N. Catalán, R. Opazo, P. Dantagnan y J. Romero. 2019. **Effect of dietary carbohydrate-to-protein ratio on gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *Animals* 9 (3): 89.
- Waiyamitra, P., M. A. Zoral, S. Saengtienchai, A. Luengnaruemitchai, O. Decamp, O., B. Gorgoglione y W. Surachetpong. 2020. **Probiotics modulate tilapia resistance and immune response against tilapia lake virus infection.** *Pathogens* 9 (11): 919, <https://doi.org/10.3390/pathogens9110919>.
- Wang Y. 2011. **Use of probiotics *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* and *Lactobacillus acidophilus* as growth promoters in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fingerlings.** *Aquaculture Nutrition* 17 (2): e372–e378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00771.x>.
- Wang, A. R., C. Ran, E. Ringø y Z. G. Zhou. 2018. **Progress in fish gastrointestinal microbiota research.** *Reviews in Aquaculture* 10 (3): 626–640.
- Wang, A., C. Ran, Y. Wang, Z. Zhang, Q. Ding, Y. Yang, R. E. Olsen, E. Ringø, J. Bindelle y Z. Zhou. 2019. **Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade.** *Fish & Shellfish Immunology* 86: 734–755.
- Wang Y. y L. Yang. 2021. **Genomic evidence for convergent molecular adaptation in electric fishes.** *Genome Biology and Evolution* 13 (3): 1-11. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab038>.

- Welker, T. L., C. Lim, M. Yildirim-Aksoy, R. Shelby y P. H. Klesius. 2007. **Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents.** *Journal of the World Aquaculture Society* 38 (1): 24-35.
- Welker, T. M., C. Lim, M. Yildirim-Aksoy y P. H. Klesius. 2012. **Effect of short term feeding duration of diets containing commercial whole cell yeast or yeast subcomponents on immune function and disease resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*.** *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96 (2): 159-171.
- Wiles, T. J., M. Jemielita, R. P. Baker, B. H. Schlomann, S. L. Logan, J. Ganz, E. Melancon, J. S. Eisen, K. Guillemin y R. Parthasarathy. 2016. **Host gut motility promotes competitive exclusion within a model intestinal microbiota.** *PLoS BIOLOGY* 14 (7): e1002517. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002517>.
- Wilhelm, R. C., R. Singh, L. D. Eltis y W. W. Mohn. 2019. **Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing.** *The ISME Journal* 13: 413–429.
- Wong S. y J. F. Rawls. 2012. **Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment.** *Molecular Ecology* 21 (13): 3100–3110.
- Wu, S. G., J. Y. Tian, F. J. Gatesoupe, W. X. Li, H. Zou, B. J. Yang y G. T. Wang. 2013. **Intestinal microbiota of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and its origin as revealed by 454 pyrosequencing.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 1585–1595.

- Wu, S., G. Wang, E. Angert, W. Wang, W. Li y H. Zou. 2012 **Composition, diversity, and origin of the bacterial community in Grass carp intestine.** *PLoS ONE* 7 (2): e30440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030440>.
- Xia, Y., J. Cao, M. Wang, M. Lu, G. Chen, F. Gao, Z. Liu, D. Zhang, X. Ke y M. Yi. 2019. **Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on colonization dynamics of gut microbiota and regulation of immunity in early ontogenetic stages of tilapia.** *Fish and Shellfish Immunology* 86: 53-63.
- Xia, Y., M. Lu, G. Chen, J. Cao, F. Gao, M. Wang, Z. Liu, D. Zhang, H. Zhu y M. Yi. 2018. **Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *Fish and Shellfish Immunology* 76: 368-379.
- Xing, M., Z. Hou, J. Yuan, Y. Liu, Y. Qu y B. Liu. 2013. **Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*).** *FEMS Microbiology Ecology* 86 (3): 432–443.
- Yao, J., P. Chen, E. Ringø, G. Zhang, Z. Huang y X. Hua. 2019. **Effect of diet supplemented with rapeseed meal or hydrolysable tannins on the growth, nutrition, and intestinal microbiota in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*).** *Frontiers in Nutrition* 6: 154. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00154>.
- Ye, L., J. Amberg, D. Chapman, M. Gaikowski y W. T. Lui. 2014. **Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish.** *The ISME Journal* 8: 541–551.

- Yu, H. H., F. Han, M. Xue, J. Wang, P. Tacon, Y. H. Zheng, X. F. Wu y Y. J. Zhang. 2014. **Efficacy and tolerance of yeast cell wall as an immunostimulant in the diet of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*).** *Aquaculture* 432: 217-224.
- Yu, L., Q. Zhai, J. Zhu, C. Zhang, T. Li, X. Liu, J. Zhao, H. Zhang, J. Tian y W. Chen. 2017. **Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation enhances growth performance and alleviates aluminum toxicity in tilapia.** *Ecotoxicology & Environmental Safety* 143: 307-314.
- Yuan, C., Y. Wei, S. Zhang, J. Cheng, X. Cheng, C. Qian, Y. Wang, Y. Zhang, Z. Yin y H. Chen. 2020. **Comparative genomic analysis reveals genetic mechanisms of the variety of pathogenicity, antibiotic resistance, and environmental adaptation of *Providencia* Genus.** *Frontiers in Microbiology* 11: 572642. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572642>.
- Yúfera, M., J. A. Mata-Sotres, C. Navarro-Guillén, F. J. Moyano y G. Martínez-Rodríguez. 2015. **Potential effect of increasing the water content in the digestibility of microdiets for fish larvae.** *Aquaculture Nutrition* 22 (5): 1116-1125. <https://doi.org/10.1111/anu.12336>.
- Zambonino-Infante J. L. y C. L. Cahu. 2010. **Effect of nutrition on marine fish development and quality.** *Recent advances in aquaculture research* 103-124.
- Zarkasi, K. Z., R. S. Taylor, G. C. J. Abell, M. L. Tamplin, B. D. Glencross y J. P. Bowman. 2016. **Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) gastrointestinal microbial community dynamics in relation to digesta properties and diet.** *Microbial Ecology* 71: 589–603.
- Zeng, A., K. Tan, P. Gong, Z. Guo, S. Wang, S. Gao, Y. Zhou, Y. Shu, X. Zhou, D. Miao, F. Zeng y H. Liu. 2020. **Correlation of microbiota in the gut of fish species and water.** *3 Biotech* 10: 472. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02461-5>.

- Zhai, Q., H. Wang, F. Tian, J. Zhao, H. Zhang y W. Chen. 2017. **Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation decreases tissue lead accumulation and alleviates lead toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Aquaculture Research* 48 (9): 5094-5103.
- Zhang, Y., B. Cao, G. Abakari, H. Tan y G. Luo. 2020. **Characterizing the bacterial community in bioflocs, culture water and intestines of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in a biofloc technology (BFT) system.** *Research Square* 1-17. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-88252/v1>.
- Zhang, M., Y. Sun, Y. Liu, F. Qiao, L. Chen, W. Liu, Z. Du y E. Li. 2016. **Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference.** *Aquaculture* 454: 72–80.
- Zhao, L., K. He, J. Luo, J. Sun, L. Liao, X. Tang, Q. Liu y S. Yang. 2020a. **Co-modulation of liver genes and Intestinal microbiome of largemouth bass larvae (*Micropterus salmoides*) during weaning.** *Frontiers in Microbiology* 11: 1332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01332>.
- Zhao, R., J. E. Symonds, S. P. Walker, K. Steiner, C. G. Carter, J. P. Bowman y B. F. Nowak. 2020b. **Salinity and fish age affect the gut microbiota of farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).** *Aquaculture* 528: 735539. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735539>.
- Zhou, Z., Ø. Karlsen, S. He, R. E. Olsen, B. Yao y E. Ringø. 2013. **The effect of dietary chitin on the autochthonous gut bacteria of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.).** *Aquaculture Research* 44 (12): 1889–1900.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

Uso de microdietas para la alimentación de las larvas de peces

Uno de los principales desafíos en la larvicultura de peces es la sustitución o disminución del alimento vivo con microdietas formuladas que reduzcan los costos de producción acuícola (Zambonino-Infante y Cahu 2007, Phelps 2010), y sean equiparables con las presas vivas (Hauville *et al.* 2014, Hansen *et al.* 2018). Se ha demostrado que las microdietas artificiales pueden ser eficientes cuando son ofrecidas como sustitutos parciales (co-alimentación) o suplementos de alimento vivo, reduciendo considerablemente el periodo de destete o transición por dietas artificiales (Mata-Sotres *et al.* 2015, Hien *et al.* 2017). Por ende, el periodo de co-alimentación con presas vivas facilita que las larvas de peces se adapten gradualmente a las características físicas y bioquímicas de la microdieta (Engrola *et al.* 2009, Herrera *et al.* 2010, Ma *et al.* 2014, Jamali *et al.* 2018), aumentando el crecimiento de las mismas y disminuyendo los costos de producción del alimento vivo (Lazo *et al.* 2000, Callan *et al.* 2003). Sin embargo, no es posible garantizar un destete exitoso con las microdietas comerciales comúnmente implementadas (Curnow *et al.* 2006, Muguet *et al.* 2011, Policar *et al.* 2013, Palinska *et al.* 2014, Hansen *et al.* 2018), debido en parte a la falta formulaciones específicas para cada especie. De acuerdo con este y otros estudios, es fundamental permitir que las larvas se adapten gradualmente a las microdietas mediante un periodo mínimo de co-alimentación de 3 a 5 días antes del destete (García-Ortega *et al.* 2003, Hauville *et al.* 2014, Mata-Sotres *et al.* 2015, Campoverde *et al.* 2017). Se ha observado que un destete abrupto sin un período de co-alimentación con presas vivas puede ocasionar estrés, mortalidad, reducir la actividad de las enzimas digestivas, deterioro de algunas células epiteliales y, por lo tanto, desnutrición del organismo (Engrola *et al.* 2007, Hamza *et al.* 2007, Trabelsi *et al.* 2011, Liu *et al.* 2012). Con base en lo anterior, las larvas de *C. estor* mostraron un menor desempeño cuando se alimentaron exclusivamente con microdietas desde la eclosión. Estos resultados sugieren que es necesario desarrollar microdietas *ad hoc* para evaluar si es posible sustituir el alimento vivo o realizar un período de co-alimentación, que se ha observado funciona en otras especies de peces. En este estudio, observamos que la proporción de proteínas solubles en las microdietas afecta significativamente el crecimiento y la supervivencia de las larvas de pez blanco, especialmente la microdieta que contiene una proporción de 278 g kg⁻¹ de la dieta presentó un mayor crecimiento en comparación con la microdieta comercial Otohime A1[®]. Skalli y colaboradores

(2014), demostraron que las microdietas con cantidades considerables de proteína soluble proporcionan un desempeño de crecimiento adecuado en las larvas de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*). Mientras que el menor peso encontrado en las larvas de *C. estor* alimentadas únicamente con Otohime[®] coincide con el reportado en larvas de pompano de Florida (*Trachinotus carolinus*) alimentadas con Otohime[®] (Hauville *et al.* 2014). El desempeño obtenido con las microdietas experimentales podría explicarse debido a los hábitos alimenticios de *C. estor*, ya que el zooplancton presenta altas proporciones de proteínas solubles, que pueden ser digeridas y absorbidas más eficientemente por las larvas de peces (Carvalho *et al.* 2004) y, serían fácilmente introducidas en los enterocitos mediante pinocitosis (Watanabe 1981, Govoni *et al.* 1986). Lo anterior es interesante debido a que se ha determinado que, del 67% de la proteína total contenida en los rotíferos, al menos 50.6% es proteína soluble (Srivastava *et al.* 2006) fácilmente digerible (Tonheim *et al.* 2007). Además, las larvas de *C. estor* parecen contar con un perfil enzimático característico, donde la actividad enzimática citosólica es alta (Toledo-Cuevas *et al.* 2011), dando lugar a una digestión eficiente de las proteínas solubles.

En general, en las microdietas experimentales observamos una geometría externa de partículas esféricas con gotas de agua deshidratadas durante las fases iniciales del proceso de secado (Rosemberg *et al.* 1988, Pedroza-Islas *et al.* 2004). Sin embargo, la morfología de estas dietas es totalmente distinta de la microdieta control Otohime A1[®] (T0) y la microdieta genérica (T1), en la que se observó una estructura amorfa. Una de las causas de la gran aceptación de las microdietas en las larvas de pez peces es atribuible al tamaño de las micropartículas (Fernández-Díaz *et al.* 1994, Zambonino-Infante y Cahu 2007). En este estudio, las microdietas experimentales (T2, T3 y T4) ofrecieron un mayor número de partículas más pequeñas (1 a 100 μm , con un promedio de 23 μm), que T0 y T1 (con un intervalo de tamaño de 1.6 a 363 μm y un promedio de 71 μm). Por lo tanto, el tamaño de partículas en relación con la apertura de la mandíbula de las larvas de *C. estor* (Ross *et al.* 2006), pueden explicar por qué las larvas que se alimentaron con las microdietas experimentales desde los 7 dpe se desempeñaron mejor en este estudio. No obstante, T0 o T1 pueden ser apropiadas para larvas más grandes (>10 dpe) ya que tienen un diámetro similar a los rotíferos adultos (120-270 μm). En la larvicultura de peces es esencial garantizar que el alimento esté disponible permaneciendo en la superficie el mayor tiempo posible, esto fue posible debido a que la mayoría de las microdietas experimentales permanecieron en la columna de agua por más de 60 minutos, garantizando la disponibilidad de

alimento para su consumo, lo cual fue garantizado por la presencia de las microdietas en el tracto intestinal de las larvas de *C. estor*.

Al suplementar la microdieta base (que contenía 278 g Kg⁻¹ de la dieta) con un consorcio de cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* 0.5 / 0.5 AP (1.27 x 10⁹ UFC g⁻¹), las larvas de pez blanco exhibieron un mejor desempeño. Similar al mostrado en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), donde el consorcio de *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* (7 x 10¹⁰ UFC g⁻¹) promovió el crecimiento de las larvas en comparación con dietas sin probióticos o suplementadas únicamente con *L. plantarum* (Beck *et al.* 2015). Desempeños similares y altas tasas de conversión alimenticia han sido observados con diferentes consorcios de cepas probióticas (Essa *et al.* 2010). Pese a que se ha sugerido que *L. acidophilus* y *L. plantarum* incrementan el apetito de los peces (Lara-Flores y Olvera-Novoa 2013, Yu *et al.* 2017, Zhai *et al.* 2017), en este estudio no se observó un aumento en la ingesta de la microdieta suplementada con altas proporciones (0.5 / 0.5) de dichas cepas probióticas, pero fue menor que la microdieta control, lo que indica una mayor eficiencia alimenticia. Esto podría deberse a que las cepas probióticas están modulando positivamente la microbiota intestinal, a la vez que proporcionan fuentes nutricionales adicionales mediante la síntesis de algunos aminoácidos, ácidos grasos de cadena corta y vitaminas (Sugita *et al.* 1991, Molina *et al.* 2009, Leblanc *et al.* 2011, Rossi *et al.* 2011). Además, es bien sabido que las cepas probióticas estimulan la actividad de las enzimas digestivas y promueven el equilibrio en el intestino (Dawood *et al.* 2015, 2016, Xia *et al.* 2018); modulando también el sistema inmunológico, lo que en la mayoría de los casos se traduce en un mayor crecimiento y supervivencia del hospedero (Balcázar *et al.* 2006, Nayak 2010). Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones en *C. estor* para describir los mecanismos y las relaciones de los probióticos y la microbiota intestinal. Los resultados del presente estudio destacan la importancia de las proteínas solubles y los efectos positivos que los probióticos aportarían a las larvas de peces a través de microdietas lo que permitiría reemplazar en parte al alimento vivo durante la larvicultura del pez blanco.

Viabilidad de probióticos en microdietas secadas por aspersión

Las cepas de *Lactobacillus sp.*, han mostrado resultados positivos en el crecimiento y supervivencia de distintas especies de peces dulceacuícolas y marinos. Sin embargo, mantener

la viabilidad de los probióticos en dietas artificiales secas es un reto (Merrifield *et al.* 2010). Como se mencionó anteriormente, en este estudio observamos que la suplementación con cepas de *L. acidophilus* La-14 en dietas microagregadas, promueve un mejor desempeño en las larvas de *C. estor*, pero también se observó una alta viabilidad (95%) de *L. acidophilus* después del proceso de secado por aspersión, esto debido a que la formulación de la microdieta tiene la capacidad de proteger a *L. acidophilus* después de someterse a las altas temperaturas del secado, tal como ha sido reportado anteriormente (Páez *et al.* 2012, Soukoulis *et al.* 2014) y, también le confiere la protección para ser almacenada hasta por seis meses a 4 °C manteniendo un recuento adecuado de UFC ($>10^9$), lo cual hace que sea viable para utilizarse como suplemento probiótico en microdietas para el cultivo larvario de peces (Hai 2015, Wang *et al.* 2019). Asimismo se presentó una alta viabilidad de esta cepa probiótica tanto en agua marina como destilada, similar a la tolerancia a diferentes salinidades reportada en algunas cepas de *Lactobacillus spp.* (Gandhi y Shah 2015). Por lo tanto, con los datos obtenidos en este estudio, es posible plantear la implementación de nuevas estrategias de alimentación mediante el uso de microdietas enriquecidas con cepas probióticas de *L. acidophilus* La-14 capaces de resistir la salinidad y el almacenamiento a largo plazo, por lo que pueden tener una aplicación importante en la industria de alimentos acuícolas.

Efecto de probióticos y prebióticos en el desempeño de las larvas

Es bien sabido que los probióticos pueden ser utilizados como promotores de crecimiento y/o supervivencia en distintas especies de peces cultivados (Nayak 2010a, Hai 2015, Dawood *et al.* 2019, Wang *et al.* 2019, Waiyamitra *et al.* 2020). Por otro lado, los prebióticos propician la respuesta inmune del hospedero y reducen el riesgo de contraer enfermedades en las primeras etapas de vida de los peces (Vandenplas *et al.* 2015) y, en algunos casos, ayudan a incrementar los factores asociados al crecimiento del organismo (Gültepe *et al.* 2012, Hoseinifar *et al.* 2013, Chen *et al.* 2014). Por ello, son considerados como suplementos alimenticios de gran importancia en la acuicultura al prevenir brotes de enfermedades y fortalecer la salud de los peces (Carballo *et al.* 2019). En el presente estudio, fue posible determinar que la suplementación individual de *L. acidophilus* en la microdieta, promueve un aumento significativo en la supervivencia de las larvas de *C. estor*, en comparación con el resto de los tratamientos de alimentación evaluados, e incluso fue mayor a las larvas alimentadas exclusivamente con rotífero (*B. plicatilis*). Resultados parecidos fueron reportados en larvas de

Chirostoma humboldtianum y *Cyprinus carpio* (Dhanaraj *et al.* 2010, Vázquez-Silva *et al.* 2017), posiblemente debido a la habilidad de los lactobacilos para colonizar el tracto digestivo e incrementar la respuesta inmune innata de las larvas de peces haciéndolas más inmunocompetentes y reduciendo su mortalidad (Al-Dohail *et al.* 2009, El-Rahman *et al.* 2009, Jatobá *et al.* 2011, Hoseinifar *et al.* 2015, Yu *et al.* 2017, Zhai *et al.* 2017, Xia *et al.* 2019). El hecho de que en este y otros estudios no haya sido posible observar diferencias significativas en el crecimiento de las larvas (Villamil *et al.* 2014), podría estar relacionado con que las concentraciones de las cepas probióticas utilizadas no fueron suficientes (10^6 a 10^{10} UFC g^{-1} de la dieta) para ejercer un efecto positivo en el crecimiento de los peces (Nayak 2010a, Ramos *et al.* 2013, Tapia-Paniagua *et al.* 2014, Dawood y Koshio 2016, Ringø *et al.* 2018, Wang *et al.* 2019), o bien, que dichas cepas son específicas para cada especie, las condiciones de cultivo y el estado fisiológico del pez (Al-Dohail *et al.* 2009, Merrifield *et al.* 2010a, Faramarzi *et al.* 2011, Wang 2011, Hoseinifar *et al.* 2015a).

Por otra parte, no hubo diferencias significativas en el crecimiento y la supervivencia de las larvas de *C. estor*, cuando fueron alimentadas con microdietas suplementadas con prebióticos de pared celular de levadura (*S. cerevisiae*) a una concentración de 25 mg kg^{-1} de la dieta. Estos datos coinciden con los reportados en otras especies de peces (Selvaraj *et al.* 2005, Welker *et al.* 2007, Burr *et al.* 2010, Mansour *et al.* 2012, Ebrahimi *et al.* 2012). Sin embargo, varias investigaciones indican que la incorporación de pared celular de levadura (*S. cerevisiae*) y sus componentes como promotor de crecimiento y/o supervivencia en las dietas para peces, podría depender de la especie cultivada, el periodo de alimentación y la concentración (mg kg^{-1}) de pared celular utilizada en la dieta (Welker *et al.* 2012, Dawood y Koshio 2016, Øverland y Skrede 2016). Con respecto a lo anterior, la evidencia muestra que para poder ejercer un efecto positivo en el crecimiento y la supervivencia de los peces, es necesario que la pared celular de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sea adicionada en concentraciones mayores a 1000 mg kg^{-1} de la dieta, dependiendo del estadio de desarrollo de los peces cultivados (Ortuño *et al.* 2002, Torrecillas *et al.* 2007, Gopalakannan y Arul 2010, Abdel-Tawwab 2012, Welker *et al.* 2012, Yu *et al.* 2014). Por lo tanto, es probable que la concentración de pared celular (25 mg kg^{-1}) administrada en la microdieta, haya sido insuficiente para promover el crecimiento y la supervivencia de las larvas de *C. estor*. No obstante, es necesario realizar nuevas investigaciones

en las que se evalúen distintas concentraciones de pared celular en el desempeño larvario durante el cultivo de esta especie.

Influencia de probióticos y prebióticos en la microbiota

El crecimiento y la salud de los peces pueden ser influenciados por su microbiota intestinal (Brown *et al.* 2012, Clements *et al.* 2014, Tran *et al.* 2017), debido a que los microorganismos que colonizan su tracto digestivo desempeñan un papel en la nutrición y bienestar de los mismos (Nayak 2010b, Ganguly y Prasad 2012, Larsen *et al.* 2014, Llewellyn *et al.* 2014, Banerjee y Ray 2017a, Tarnecki *et al.* 2017), pero su importancia puede variar según la especie (Legrand *et al.* 2018, Mente *et al.* 2018).

La microbiota del tracto digestivo de las larvas de *C. estor* estuvo representada principalmente por los phyla Proteobacteria, Chloroflexi, Planctomycetota, Acidobacteria y Firmicutes. De los cuales Proteobacteria fue el más abundante en todos los tratamientos de alimentación, sin embargo, la suplementación de probióticos y/o prebióticos en las microdietas provoca cambios en la microbiota de las larvas, favoreciendo la proliferación de bacterias del phylum Proteobacteria. Esto que coincide con lo reportado en diversas especies de peces alimentados con alimento vivo y dietas formuladas (Li *et al.* 2012, Xing *et al.* 2013, Bakke *et al.* 2015, Ghanbari *et al.* 2015, Parris *et al.* 2016, Hughes *et al.* 2017, Bruni *et al.* 2018, Jiang *et al.* 2019, Nikouli *et al.* 2019, Ou *et al.* 2019, Tyagi *et al.* 2019, Hu *et al.* 2021). Aunque, cuando las larvas de pez blanco fueron alimentadas con microdietas suplementadas con cepas probióticas de *L. acidophilus* y/o prebióticos de pared celular de levadura (*S. cerevisiae*) la abundancia de Proteobacteria incrementó aún más constituyendo más del 50% de la microbiota, similar a lo encontrado en el tracto digestivo de peces dulceacuícolas y marinos suplementados con probióticos (Tapia-Paniagua *et al.* 2014, Vázquez-Silva *et al.* 2017, González-Félix *et al.* 2018, Xia *et al.* 2018). Posiblemente debido a que las Proteobacterias intervienen en múltiples funciones metabólicas llevadas a cabo en el tracto digestivo de los peces, a la vez que activan distintos mecanismos de defensa, promoviendo su supervivencia (Swanson *et al.* 2011, Bradley y Pollard 2017, Pereira y Berry 2017, Hu *et al.* 2021). Pero estos resultados difieren de los reportados en la microbiota de larvas y juveniles de distintas especies de peces (Gonçalves y Gallardo-Escárte 2017, Villasante *et al.* 2019, Le *et al.* 2020, Zhao *et al.* 2020a). Pese a que los Firmicutes forman parte de la microbiota autóctona de los peces (Roeselers *et al.* 2011, Wu

et al. 2013, Xing *et al.* 2013), y es uno de los phyla más importantes en la nutrición de los mismos (Ley *et al.* 2005, Ni *et al.* 2014, Dugas *et al.* 2016, Mekuchi *et al.* 2018, Mikolajczyk *et al.* 2019), la abundancia de este phylum en las larvas de *C. estor* fue relativamente baja y traducida en una menor tasa de crecimiento. Planctomycetota o Planctomycetes fue el segundo phylum más dominante en la microbiota de las larvas de *C. estor* y también es uno de los phyla más abundantes en la microbiota intestinal de otros peces (Parris *et al.* 2016, Nikouli *et al.* 2019, McDonald *et al.* 2019, Parata *et al.* 2020, Patula *et al.* 2021), que puede encontrarse naturalmente en los sedimentos y distintos cuerpos de agua (Lage *et al.* 2012, Baldo *et al.* 2015, Hermans *et al.* 2017), realizando funciones importantes en la fermentación de algunos tipos de carbohidratos (Elshahed *et al.* 2007, Villasante *et al.* 2019). Aunque, la función precisa de estas bacterias en el tracto digestivo de los peces no es totalmente clara, se asume que podrían vivir de metabolitos producidos por otras bacterias (Rawls *et al.* 2006, Ley *et al.* 2008), pero es probable que estas bacterias desempeñen un papel fundamental en el metabolismo de compuestos más complejos (Bengtsson y Øvreås 2010, Wilhelm *et al.* 2019). Otro de los taxones predominantes en la microbiota de larvas de *C. estor* fue Chloroflexi, cuya abundancia es parecida a la identificada en otras especies de peces de importancia comercial (Ghanbari *et al.* 2017, Lavoie *et al.* 2018, Mekuchi *et al.* 2018, Nikouli *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2020, Patula *et al.* 2021). Este phylum ha sido frecuentemente asociado con sedimentos de distintos ambientes acuáticos y granjas de peces (van Kessel *et al.* 2011, Wu *et al.* 2012, Ye *et al.* 2014, Li *et al.* 2015), donde podrían llevar a cabo sus potenciales funciones en el metabolismo de carbohidratos, compuestos nitrogenados, biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta (Hug *et al.* 2013, Nierychlo *et al.* 2019). No obstante, su función exacta en el tracto digestivo del hospedero aún se desconoce, aunque la gran abundancia de Planctomycetes y Chloroflexi en las larvas de *C. estor* podría ser resultado de la incorporación de algunos ingredientes de origen vegetal en las microdietas experimentales, como ha sido reportado en larvas de *Danio rerio* (Patula *et al.* 2021). Por otro lado, altas abundancias de Acidobacteria igualmente han sido detectadas en numerosas especies de peces (Roeselers *et al.* 2011, Li *et al.* 2014, Bakke *et al.* 2015, Dehler *et al.*, 2017, Mekuchi *et al.* 2018, Mente *et al.* 2018, Nikouli *et al.* 2019). A pesar de que la función de este phylum es casi desconocida, se ha inferido que promueve la degradación, utilización y biosíntesis de polisacáridos estructurales e intervienen en el metabolismo de fuentes de nitrógeno (Rawat *et al.* 2012, Eichorst *et al.* 2018, Domeignoz-

Horta *et al.* 2019, Kalam *et al.* 2020), por lo que las Acidobacterias podrían realizar una función importante en el tracto digestivo y el ambiente de cultivo de las larvas de *C. estor*. Sin embargo, la composición y abundancia de los phyla que componen la microbiota del pez blanco es distinta a las identificadas en otras especies de peces (Ye *et al.* 2014, Huyben *et al.* 2018, Escalas *et al.* 2021) y, podrían ser consecuencia, entre otras cosas, de las diferentes dietas utilizadas, debido a que esta es considerada como el factor principal que incide en la estructura y composición de las comunidades microbianas del tracto digestivo de las larvas de peces (Zhou *et al.* 2013, Hartviksen *et al.* 2014, Wang *et al.* 2017, Nikouli *et al.* 2019), y estas comunidades a su vez afectan las funciones digestivas y las respuestas inmunológicas de cada especie (Bruni *et al.* 2018).

A nivel de género *Nitrosomonas*, *JG30-KF-CM45*, *Providencia*, *Luteitalea* y *Ruminococcus* fueron los taxones dominantes en la microbiota del tracto digestivo de las larvas de *C. estor*. Entre ellos, *Nitrosomonas* es relevante por su capacidad antioxidante para transformar el amoníaco en nitrito (Legrand *et al.* 2018), limitando la toxicidad del amoníaco sin que el nitrito sea nocivo para los peces cultivados y proporciona nutrientes para que otras bacterias puedan realizar sus funciones (van Kessel *et al.* 2016, Mekuchi *et al.* 2018, Jiang *et al.* 2019, Fossmark *et al.* 2021). Por otra parte, la abundancia de *Providencia* fue notoria y puede incrementar todavía más si las larvas de *C. estor* son alimentadas con microdietas suplementadas con *L. acidophilus* y pared celular de levadura (*S. cerevisiae*). Pese a que las bacterias de este género forman parte de la microbiota comensal de algunos peces (Interaminense *et al.* 2010, Ramkumar *et al.* 2014, Tu *et al.* 2014), interviniendo en el metabolismo y transporte de aminoácidos, lípidos y carbohidratos presentes en la dieta (Yuan *et al.* 2020), en condiciones desfavorables podrían convertirse en bacterias oportunistas para los peces cultivados y el consumidor final (Kurmasheva *et al.* 2018, Ramesh y Souissi 2018, Souza *et al.* 2019). La abundancia de bacterias desnitrificantes del género *JG30-KF-CM45* (Han *et al.* 2019) registradas en este estudio coincide con la informada en otras especies de peces (Yao *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2020). Mientras que el género *Luteitalea* es frecuente en todo tipo de sedimentos y medios ácidos (Huang *et al.* 2016, Vieira *et al.* 2017, Huber y Overmman 2018), participando en la digestión de carbohidratos y algunos aminoácidos (Kalam *et al.* 2020). Aunque, hasta donde sabemos esta es la primera vez que son reportadas en la microbiota de los peces. La presencia de *Ruminococcus* concuerda con la identificada en otros peces zooplanctófagos (Jiang *et al.* 2019,

Li *et al.* 2019, Escalas *et al.* 2021). La dominancia de estos géneros podría deberse a su presencia en la dieta o en el ambiente de cultivo, la exclusión competitiva, o bien, a que dichos taxones son transmitidos entre individuos (David *et al.* 2014, Bauer *et al.* 2018, Coyte y Rakoff-Nahoum 2019).

La determinación de la microbiota núcleo en los peces es fundamental para poder deducir las funciones metabólicas o adaptaciones realizadas por las bacterias que habitan en su tracto digestivo (Mueller y Sachs 2015, Macke *et al.* 2017, Mente *et al.* 2018, Kokou *et al.* 2019, Sharpton *et al.* 2021). La microbiota núcleo de las larvas de *C. estor* fue relativamente amplia (102 OTU's) respecto a otras especies de peces (Ye *et al.* 2014, Li *et al.* 2015). Mientras que un intervalo de 7-48 OTU's fueron únicos para cada tratamiento de alimentación, similar a lo observado en otras especies de peces (Mente *et al.* 2018), lo anterior podría implicar que las bacterias sean transitorias o realicen funciones específicas para cada comunidad de microorganismos que habitan en el tracto digestivo de los peces (Wang y Yang 2021, Zeng *et al.* 2020, Kokou *et al.* 2019) quizás como consecuencia de distintos procesos fisiológicos o efectos funcionales importantes para el hospedero (Wiles *et al.* 2016, Sharpton *et al.* 2021). No obstante, debido a que la microbiota de los peces es dinámica (Giatsis *et al.* 2014, Baldo *et al.* 2015, Zarkasi *et al.* 2016), es posible que ésta disminuya o cambie su conformación según la adaptación del organismo a diferentes tipos de dietas, ambientes específicos y la edad del pez (Liu *et al.* 2016, Parris *et al.* 2016).

Finalmente, de acuerdo con estudios predictivos de PICRUSt (Langille *et al.* 2013) los taxones dominantes en la microbiota de las larvas de pez blanco podrían intervenir en el metabolismo de los diferentes nutrientes contenidos en las microdietas, a la vez que propician la activación del sistema inmunológico y la respuesta contra el estrés provocado durante el cultivo (Xing *et al.* 2013, Mekuchi *et al.* 2018, Villasante *et al.* 2019, Hu *et al.* 2021). Sin embargo, la sola presencia de un microorganismo en particular no necesariamente implica una función (Bruni *et al.* 2018). Por lo tanto, es necesario realizar estudios predictivos para identificar las funciones metabólicas potenciales de las bacterias que conforman la microbiota de las larvas de *C. estor*.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Las larvas de *C. estor* aceptan microdietas formuladas desde la eclosión, pero cuando las larvas son destetadas después de tres días de co-alimentación con rotíferos vivos se obtiene un rendimiento larvario similar a las alimentadas exclusivamente con rotíferos. La morfología de las partículas, la flotabilidad y el tamaño de las microdietas permitieron que las larvas se alimentaran de ellas para obtener un buen crecimiento, independientemente de las proporciones de fuentes de proteínas solubles en la dieta, donde únicamente las larvas que consumieron la microdieta que contenía 278 g kg⁻¹ mostraron un crecimiento mayor que las alimentadas con la microdieta comercial Otohime[®] (T0).

La suplementación de la microdieta que contenía 278 g kg⁻¹ con un consorcio bacteriano de *Lactobacillus acidophilus* y *L. plantarum* en una proporción de 0.5 / 0.5% (1.27 x 10⁹ UFC g⁻¹) aumentó significativamente el desempeño larvario, en comparación con el resto de las microdietas y los rotíferos vivos. Esto sugiere que la microdieta 25f:75s adicionada con *L. acidophilus* y *L. plantarum* (0.5 / 0.5%; 1.27 x 10⁹ UFC g⁻¹) presenta un gran potencial como un sustituto de las presas vivas para la alimentación de larvas de pez blanco a partir de 10 días post-eclosión.

Los estudios de viabilidad determinaron que las cepas de *L. acidophilus* se mantienen después del secado por aspersión y pueden ser almacenadas hasta por seis meses a 4 ° C manteniendo un recuento adecuado de UFC (>10⁹), por lo que pueden utilizarse como suplemento probiótico en microdietas para larvas de peces, por un buen período de tiempo sin perder su capacidad de acción.

Por último, la suplementación de probióticos y/o prebióticos de pared celular de *S. cerevisiae* en microdietas para la alimentación de larvas de *C. estor*, ocasionan cambios sustanciales en la microbiota de la especie. El conocimiento generado sobre la microbiota núcleo de las larvas de *C. estor*, permitirá identificar las comunidades bacterianas intestinales, así como sus genes y/o potenciales funciones durante las primeras etapas de vida del pez, lo cual es relevante debido a que las bacterias que constituyen la microbiota núcleo de las larvas, pudieran ser fundamentales para la salud y fisiología de esta especie.