



Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola

**Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez,
Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe
Nieto López, David A. Villarreal Cavazos,
Julián Gamboa Delgado, y Carlos A.
Martínez Palacios**

Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola

2022, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios.

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2022

Copias disponibles en:
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa Maricultura
Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
C.P. 66455
Tel.+Fax. 818352 6380
E-mail: lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

- Autores del escrito. 2022. Nombre del artículo. Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios. Investigación e innovación en nutrición acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.473 ISBN: 978-607-27-1732-9. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias

Directorio

Dr. Santos Guzmán López
Rector

Dr. Juan Paura García
Secretario. General

Dr. Celso José Garza Acuña
Secretario extensión y cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas
Director de Editorial Universitaria

Dr. José Ignacio González Rojas
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

Editores

Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, y Carlos A. Martínez Palacios.

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455
Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx
Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2022. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha Guadalupe Nieto López, ©David Alonso Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado, ©Carlos A. Martínez Palacios.

ISBN:978-607-27-1732-9. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores. El contenido es responsabilidad de los autores.

Párrafo legal: Reservado todos los derechos conforme a la ley. Prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin previa autorización por escrito del titular propietario y editor de la obra.

Bioencapsulación de Levadura Probiótica para Larvas de *Seriola rivoliana*

Teles, A.^{1,3}, Tovar-Ramírez, D.², Alvarez-González, C.A.¹, Guzmán-Villanueva, L.^{1,4},
Burgoin, M.², Linares-Aranda, M.², Lucero-Rivera, Y.E.²

¹Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIOL-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas Km 0.5, Villahermosa, Tabasco, 96139, México. ²Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Calle Instituto Politécnico Nacional 195, La Paz, B.C.S. 23096, México. ³Departamento de Ingeniería en Pesquerías, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Sur KM 5.5, 23080 La Paz, B.C.S., México. ⁴Cátedra - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT.

Correo electrónico: and.teles84@gmail.com

Resumen

La actividad acuícola crece de manera exponencial, lo que implica la necesidad de alternativas a los métodos tradicionales de producción para disminuir el estrés animal y ambiental. Entre las alternativas utilizadas para el desarrollo sostenible de la actividad, está el uso de los probióticos que son capaces de modular la microbiota intestinal, estimular la respuesta inmune y la maduración del tracto digestivo de larva y juveniles de peces. Este trabajo tiene como objetivo presentar un panorama de los trabajos desarrollados con el uso de *Debaryomyces hansenii* sobre la fisiología digestiva de larvas y juveniles de peces marinos (*Mycteroperca rosacea*, *Lutjanus guttatus*), así como como la eficiencia del uso de alimento vivo como vector de *D. hansenii* para larvas de *Seriola rivoliana*. Los resultados obtenidos demuestran la eficacia en el uso de la levadura *D. hansenii* como probiótico para las larvas y juveniles de peces de interés comercial, con resultados en el incremento de la actividad de enzimas digestivas y modificación de la morfología intestinal. Los análisis de microscopía electrónica de barrido demostraron la capacidad de la levadura de pasar por el tracto digestivo de las larvas y juvenil y mantenerse viva, ya sea vía alimento inerte o vía alimento vivo a través de bioencapsulación, además, es posible observar los sitios de adhesión de la levadura en la mucosa intestinal. Con los resultados obtenidos se demuestra la posibilidad de administrar la levadura probiótica desde etapas tempranas de desarrollo lo que puede resultar en mejores índices zootécnicos y así establecer protocolos más eficientes de producción.

Palabras clave: *Debaryomyces hansenii*, enriquecimiento, alimento vivo, peces marinos.

Introducción

La acuicultura desempeña un papel fundamental a la hora de proporcionar medios de vida sostenibles y seguridad alimentaria a la creciente población mundial, por ello, se ha aplicado una intensificación de las prácticas acuícolas para mantener altos niveles de producción, lo que ha provocado un aumento del estrés de los animales acuáticos y del medio ambiente (Dawood *et al.*, 2019). Esta intensificación, hizo amplio el uso de alimentos industrializados y sustancias anti microbianas agregadas al alimento convencional con el objetivo de promover el crecimiento, sin embargo, en la actualidad, el interés de los consumidores por productos seguros y sin fármacos, y la necesidad de una acuicultura sostenible han alentado a la comunidad de investigación científica a utilizar los probióticos como una estrategia de salud respetuosa con el medio ambiente para contrarrestar las enfermedades de la acuicultura y disminuir el estrés animal y ambiental (Carnevali *et al.*, 2017; Dawood *et al.*, 2019; Vincent *et al.*, 2019).

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas entran al sistema gastrointestinal del hospedero, se mantienen vivos y son aptos a colonizar el intestino con la finalidad de aportar salud al hospedero incrementando el balance microbiano del intestino (Gatesoupe, 1999; Buzzini y Vaughan-Martini, 2006; Schepper *et al.*, 2017). Una vez administrados son aptos a colonizar y multiplicarse en el organismo del hospedero y ejercer numerosos efectos benéficos con capacidad para modular diferentes sistemas biológicos en el hospedero, así como recuperar el equilibrio de la microbiota cuando esta se ve afectada luego del uso de antibióticos (Cross, 2002; Yukgehnaish *et al.*, 2020).

Estos aditivos han sido evaluados desde diferentes enfoques en peces, desde parámetros zootécnicos hasta a nivel molecular, y han favorecido al desarrollo, la disminución de deformidades, incremento en la respuesta inmune, maduración digestiva, la modulación de la microbiota intestinal entre otros efectos positivos en la producción de larvas y juveniles de peces (Tovar-Ramírez *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2021; Vargas-Albores *et al.*, 2021) y pueden ser suministrados de diferentes maneras, ya sea a través de baños o a través de la alimentación (Hasan y Banerjee 2020), siendo la suplementación de alimentos con probióticos considerado el mejor método para lograr el éxito en la colonización y establecimiento en el tracto,

principalmente en la etapa larval que es considerada la etapa crítica en la producción de peces en la cual la maduración del tracto digestivo no está completamente establecida.

En este ámbito, uno de los métodos para la administración de probióticos a larvas de peces de desarrollo altricial, es a través del alimento vivo, ya que son organismos capaces de tomar estas bacterias o levaduras probióticas a través de la filtración e incorporación en su tracto digestivo o por adhesión en su exterior (Ishthiaq *et al.*, 2021), éste proceso conocido como bioencapsulación o enriquecimiento.

La bioencapsulación y el enriquecimiento son técnicas que están evolucionando en la acuicultura que consisten en la incorporación de productos (ej. aditivos funcionales) en alimento vivo y que se emplean habitualmente para mejorar la calidad nutricional de los alimentos vivos mediante la integración de nutrientes en ellos y para que el aditivo funcional pueda llegar intacto a la larva, lo que posteriormente mejora el crecimiento, la supervivencia y la resistencia a las enfermedades del hospedero, (Samat *et al.*, 2020; Ishthiaq *et al.*, 2021). Este trabajo tiene como objetivo presentar un panorama de los estudios realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) con la levadura *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 sobre la fisiología digestiva de larvas y juveniles de peces marinos, así como determinar la eficiencia del uso de rotíferos y metanauplios de *Artemia sp.* como vectores de la levadura probiótica para larvas de *Seriola rivoliana*.

Las levaduras como probióticos

Las levaduras son organismos ubicuos que son diseminados por los animales, el aire y las corrientes de agua, por lo que pueden ser detectadas en el tracto digestivo, tanto de peces silvestres como cultivados (Tovar-Ramírez *et al.*, 2008; Reyes-Becerril *et al.*, 2020; Angulo *et al.*, 2020; Vargas *et al.*, 2021).

Estos organismos han demostrado el potencial para producir sustancias bioactivas, como glucanos, glutatión, toxinas, enzimas, fitasa y vitaminas con aplicación en la acuicultura, la industria química, la cosmética, la alimentación y la industria farmacéutica (Ceseña *et al.*, 2021). Son aditivos populares en la acuicultura (enteras o en fracciones) como suplementos en la alimentación de los organismos como fuente de aminoácidos, proteínas y vitaminas, principalmente del complejo B, con un efecto positivo en el crecimiento y la inmunidad (Huyben *et al.*, 2018; Angulo *et al.*, 2020; Reyes-Becerril *et al.*, 2020; Ceseña *et al.*, 2021).

Otro uso dado a las levaduras en acuicultura es en el control de enfermedades (bacterias o virus) y la reducción de la aplicación de antibióticos y otros productos químicos que afectan a la resistencia de los microorganismos o a la patogénesis, pues cabe mencionar que las levaduras son resistentes a los antibióticos (Ceseña *et al.*, 2021).

A pesar de que los reportes referentes a la utilización de probióticos en acuicultura están concentrados en su mayoría en bacterias, las levaduras han demostrado también un gran uso potencial además de que éstas pueden llegar a ser centenares de veces más grandes que las bacterias, lo que puede explicar que la introducción de una pequeña población (10^4 CFU g^{-1}) a través del alimento puede inducir en efectos benéficos significantes para el hospedero (Tovar-Ramírez *et al.*, 2004; Sen y Mansell 2020; Borges *et al.*, 2021; Loh *et al.*, 2021; Vargas *et al.*, 2021).

Las levaduras han sido identificadas como parte de la microbiota normal tanto de peces silvestres como de peces cultivados y su papel en la salud y nutrición del pez ha sido abordado en la literatura, siendo utilizada tanto vivas, como enriquecedor para alimento vivo, o procesadas como ingrediente de la dieta, demostrando una colonización artificial del intestino del hospedero (Navarrete y Tovar-Ramírez, 2014).

Especies de levadura como *Candida* sp., *C. utilis*, *C. sake*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces* sp., *D. hansenii*, *Hanseniaspora* sp., *Kloeckera* sp., *Kluyveromyces* sp., *Leucosporidium* sp., *Metschnikowia* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *R. rubra*, *R. glutinis*, *Saccharomyces* sp., *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces* sp., *Trichosporon* sp. y *Yarrowia* sp. han sido aplicadas en la producción acuícola (Ceseña *et al.*, 2021).

Debaryomyces hansenii

De la amplia diversidad de microhongos se destaca la levadura *D. hansenii* la cual es una especie extremófila de la Familia Saccharomycetaceae, que puede ser encontrada en muchos hábitats, como en agua marina, de donde fue inicialmente aislada, queso, carne, vino, cerveza, frutas y suelo, así como en productos ricos en azúcar. Posee características promisoras para aplicaciones biotecnológicas por su oleaginidad y halotolerancia, capaz de crecer en medios conteniendo arriba de los 4 M NaCl, mientras el crecimiento de *S. cerevisiae* está restringido a medios conteniendo menos de 1.7 M NaCl. Su osmotolerancia es altamente ventajosa para varias aplicaciones biotecnológicas pues ésta permite una producción no

estéril y altas concentraciones de producto, condiciones que permiten una dramática reducción de costos en el sector agroalimentario (Breuer y Harms, 2006). Además de ser una especie de levadura conocida por sus características halotolerantes, está incluida en la lista QPS EFSA (Presunción de calidad como segura - Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), puede resultar atractiva para aplicaciones relacionadas con piensos o alimentos (Donzella *et al.*, 2021).

El conocimiento de esta levadura es muy limitado, por ello, *D. hansenii* puede considerarse una "cenicienta" en el mundo de los microorganismos, ya que no se ha impulsado suficientemente la investigación de sus diversos aspectos destacables (Prista *et al.*, 2016). En los últimos años ha sido objeto de estudios relacionados a la fisiología digestiva, respuesta inmune, crecimiento y supervivencia de larvas y juveniles de peces marinos (Tovar-Ramírez *et al.*, 2002, 2010; Guzmán-Villanueva *et al.*, 2007; Reyes-Becerril *et al.*, 2008, 2011; Angulo *et al.*, 2017) y este aumento en el número de reportes en el uso de *D. hansenii* como probiótico (Angulo *et al.*, 2020; Reyes-Becerril *et al.*, 2020; Donzella *et al.*, 2021), nos permite conocer la capacidad de esta levadura para mejorar el crecimiento, la supervivencia y la maduración intestinal y mejorar los sistemas inmunitario y antioxidante en larvas y juveniles de peces.

Uso de *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) en la fisiología y morfología del tracto digestivo de larvas y juveniles de peces marinos.

Han sido desarrollados estudios en el Laboratorio de Fisiología digestiva y genómica funcional del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, con el intuito de identificar los efectos del uso de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 (aislada del tracto digestivo de trucha arcoíris) sobre la fisiología digestiva de larvas y juveniles de peces marinos de interés comercial, como la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*, cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* y el pez fuerte (jurel) *Seriola rivoliana*.

Mycteroperca rosacea

Para el estudio realizado con juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*, se adicionó la *D. hansenii* (cepa CBS 8339) en el alimento microparticulado al 1.1% (Tovar-Ramírez *et al.*, 2002), por un período de 4 semanas. Se cuantificaron las enzimas lipasa, tripsina, (páncreas), pepsina (estómago) y aminopeptidasa (intestino). Se analizaron también segmentos intestinales de la parte anterior, media y posterior, para localizar y cuantificar las levaduras adheridas por microscopía electrónica de barrido (MEB). Al final del período experimental se recuperaron y cuantificaron las levaduras presentes en el intestino en medio YPD sólido (cuenta viable).

La actividad de las enzimas cuantificadas, presentaron cambios que se relacionan con la presencia de las levaduras en el alimento y sitios de fijación al tracto digestivo. Se observó que los peces alimentados con levaduras en la dieta presentaron un peso mayor, ($P < 0.05$) así como el mayor número de ciegos pilóricos ($P < 0.05$). El número de ciegos está relacionado íntimamente con la capacidad digestiva del pez, pues es aquí donde se llevan a cabo importantes funciones tales como la digestión complementaria de lípidos y carbohidratos, absorción de aminoácidos (Krogdahl *et al.*, 1999) y sobretodo, almacén temporal de enzimas digestivas activas.

La observación del epitelio intestinal con MEB, confirmó la capacidad de adhesión de la levadura al intestino de la cabrilla sardinera (Fig. 1 y 2); se observaron levaduras en los segmentos intestinales durante las 4 semanas del experimento. Estos hallazgos demuestran la capacidad de la levadura para permanecer íntegra una vez pasado por el tracto digestivo del juvenil, además de adherirse a la pared intestinal.

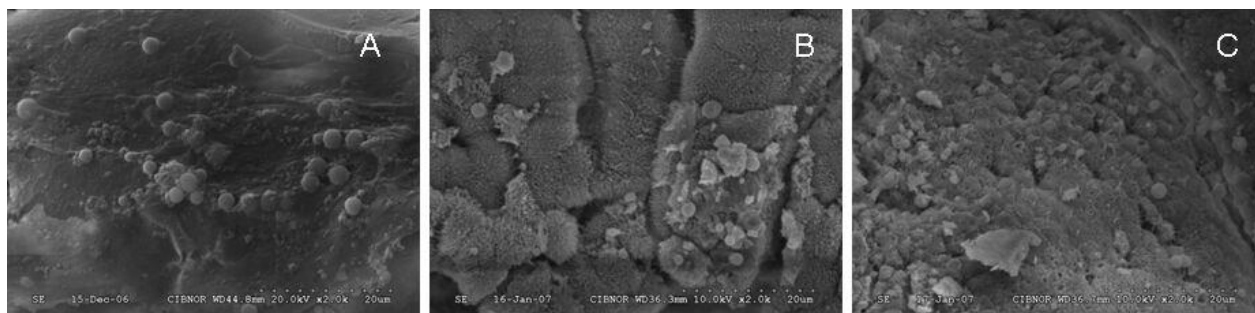


Figura 1. Presencia de levaduras *Debaryomyces hanseii* en los diferentes segmentos intestinales de juveniles de *Mycteroperca rosacea*. A) anterior; B) medio; C) posterior.

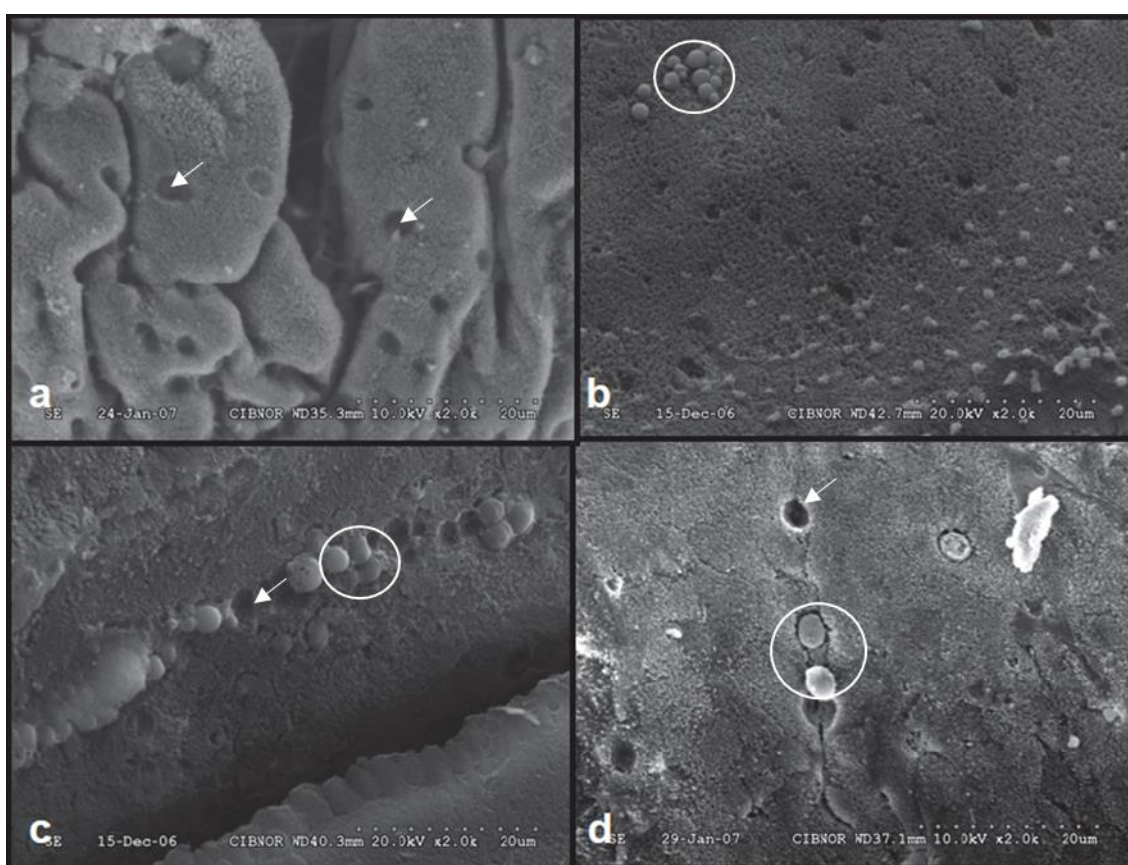


Figura 2. Marcas de los sitios de adhesión de las levaduras *Debaryomyces hanseii* en intestino posterior de juveniles de *Mycteroperca rosacea*. Las flechas indican las marcas en el intestino dejadas por las levaduras; los círculos indican la presencia de las levaduras adheridas al intestino.

Lutjanus guttatus

La posibilidad de utilizar el alimento vivo como vehículo para administración de aditivos funcionales, es de interés para la producción de larvas de peces de ontogenia indirecta, ya que desde las primeras etapas del desarrollo pueden beneficiarse de los efectos del aditivo alimentario administrado, modulando la actividad de enzimas y hormonas digestivas, desarrollo del tracto digestivo, mejora de la capacidad inmune entre otros, que repercute en la salud, mayor supervivencia y mejor desarrollo general de larvas hasta la etapa de juveniles. En este ámbito, se realizó experimento con larvas del pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*), en el cual se administró levadura *D. hansenii* (CBS 8339) vía rotífero. Este trabajo tuvo como objetivo, conocer el efecto de la incorporación de hidrolizados solubles de pescado y de la levadura *D. hansenii* incorporada a rotíferos *Brachionus rotundiformis*, sobre la expresión de genes marcadores de la maduración digestiva en larvas de *L. guttatus*.

Se utilizaron diferentes tratamientos (inanición, control, tratamiento con levadura y tratamiento con hidrolizado), se analizó la calidad de huevos y larvas, tasa de crecimiento absoluta (TCA) y supervivencia, la expresión de genes codificantes de enzimas digestivas (α -amilasa, lipasa, quimotripsina y tripsina) y hormonas del control alimenticio (Colecistoquinina; CCK, y Neuropeptido Y; NPY) en huevos y larvas de 1 y 4 días después de la eclosión (DDE).

A los 4 DDE, el tratamiento con levadura mostró diferencia significativa ($P < 0.05$) en la expresión de las enzimas digestivas lipasa y α -amilasa cuando comparado a los demás tratamientos (Fig. 3). Lo que demuestra la capacidad de *D. hansenii* sobre la modulación de la expresión de enzimas digestivas desde etapas tempranas de desarrollo y durante un corto período de administración.

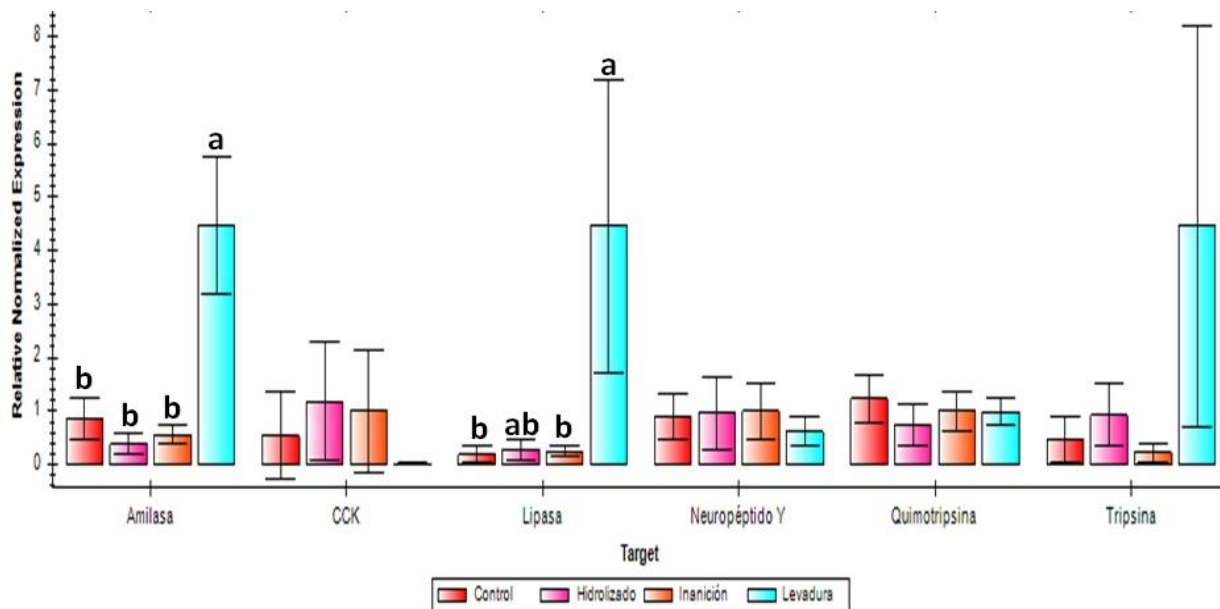


Figura 3. Análisis de expresión de genes en larvas de *Lutjanus guttatus* al 4 DDE. Los datos están representados como media \pm error estándar. Las diferentes letras indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos.

Bioencapsulación de levadura *D. hansenii* (CBS 8339) para larvas de *Seriola rivoliana*

Entre las especies con potencial de cultivo a escala comercial, está el jurel *S. rivoliana*, considerada una especie de piscicultura marina emergente (Roo *et al.*, 2014; Teles *et al.*, 2017; 2019). Son larvas altriciales que requieren de alimento vivo durante sus primeras etapas y presentan altas mortalidades durante la etapa larvaria. Como mencionado anteriormente una de las alternativas a los esquemas tradicionales de producción para aumentar las tasas de supervivencia y mejora en la salud de larvas de peces marinos, es el uso de probióticos, cuya utilización se incrementa cada vez más debido a los efectos benéficos que éstos aportan al hospedero.

Para identificar la capacidad del alimento vivo como vector de la levadura a la larva, se realizaron experimentos de bioencapsulación de rotíferos y metanauplios de *Artemia*, inoculados con *D. hansenii*.

Metodología

Producción de *Debaryomyces hansenii*.

La cepa CBS 8339 se aisló del tracto digestivo de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Andlid *et al.*, 1995). Las células se cultivaron a 30 ° C durante 24 horas en medio YPD (extracto de levadura; peptona; dextrosa) agar suplementado con ampicilina (50 mg L⁻¹). Las colonias se subcultivaron en 150 mL de medio YPD líquido con agitación a 150 rpm a 30 ° C durante 24 horas, luego se realizó una nueva incubación en matraces de 2 L con medio YPD líquido con agitación durante 24 horas. Las células se recuperaron del medio de cultivo mediante centrifugación (5 min, 1000 x g, 4 ° C).

Marcación de la levadura

Para poder observar la levadura en el interior del alimento vivo a través de microscopia de fluorescencia, se marcó la levadura con 5-DTAF (5-(4,6 diclorotriazinil) aminofluoresceína (Sigma D 0531, Madrid, España) de acuerdo con Tovar-Ramírez *et al.*, (2002). Se homogeneizaron 2 mg de DTAF en 10 ml de solución 0,05 M Na HPO₄ -0,85% NaCl luego, la solución se filtró a 0,2 mm y se manipuló en condiciones estériles. Los cultivos de levadura en medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) se centrifugaron durante 10 min a 2700 x g y lo precipitado se re suspendió en la solución DTAF, luego se incubaron en un baño de agua a 37 ° C durante 2 h. Después de una segunda centrifugación, los pellets se enjuagaron en 10 ml de agua de mar mezclada con agua destilada (18 UPS), y luego se centrifugaron de nuevo. Los pellets se re suspendieron en una mezcla de 2 ml de glicerol, 4 ml de agua de mar a 36 psu y 4 ml de agua destilada. Se almacenaron alícuotas de 1 ml a -80 ° C, hasta su uso.

Alimento vivo

Para los experimentos, se utilizaron como alimento vivo rotíferos *Brachionus* sp. y *Artemia* sp. Los rotíferos fueron cultivados en tanques cilindrocónicos de fibra de vidrio a una densidad promedio de 400 rotíferos mL⁻¹, alimentados con alimento comercial Ori-One® (Skretting, Stavanger, Norway) 4 veces al día a una concentración de 0.5 g x 10⁶ rotíferos. Los quistes de *Artemia* (Biogrow, Proveedor de Insumos Acuícolas, S. A de C.V. Mazatlán, Mexico) fueron desinfectados con hipoclorito a una concentración de 20 ppm en agua dulce

por 1 hora. Una vez desinfectados, los quistes fueron transferidos a tanques de eclosión, con iluminación intensa (3000 lux), temperatura de 30 °C y fuerte aireación por 24 horas. Pasadas las 24 horas, los nauplios fueron cosechados, filtrados en tamiz de 100 µm, lavados y transferidos a los tanques de enriquecimiento por 12 horas.

Alimento vivo como vector de la levadura

Para verificar si el rotífero y la *Artemia* son vectores adecuados para la levadura, para que ésta pueda llegar intacta hasta el organismo hospedero, esto fue verificado mediante la incubación de los rotíferos y metanauplios con levaduras marcadas con DTAF. Se colectaron 100 mL de rotíferos directamente de los tanques de cultivo (400 rotíferos mL⁻¹) y se agregó la levadura (1 g de levadura/10⁶ de rotíferos), y se incubaron 100 µL en tubos Eppendorf durante los siguientes tiempos: 5, 10 y 15 minutos por triplicado.

Para la *Artemia*, se pesó 1 gramo de quiste, se hidrataron con agua dulce por una hora. Luego los quistes fueron lavados y colocados en tanque incubadora con agua de mar (36 g L⁻¹), fuerte aireación e iluminación por 24 horas. Pasadas las 24 horas los nauplios fueron cosechados, lavados con agua de mar, contados (150,000 nauplios) y sembrados en el estanque incubadora con agua de mar, aireación moderada, por otras 24 horas. Pasadas las 24 horas éstos ya eran metanauplios que fueron cosechados.

Se incubaron muestras por triplicado de 500 µL de metanauplios en tubos Eppendorf con 40 µL de levadura marcada, durante los siguientes tiempos: 5, 15, 20, 35, 45 y 50 minutos por triplicado.

Se tomó una alícuota de 30 µL (alimento vivo + levadura) que fue depositada en un porta objeto para observación en microscopia de fluorescencia.

Integridad la levadura en el tracto digestivo de rotíferos y metanauplios de Artemia

Una vez conocido el tiempo ideal de incubación, fue realizado un análisis del tracto de los rotíferos y metanauplios de *Artemia* por medio de microscopia electrónica de barrido para verificar si las levaduras se mantenían íntegras en el tracto digestivo. El protocolo de enriquecimiento siguió la misma metodología mencionada anteriormente. Una vez cosechados los rotíferos y metanauplios, éstos fueron inoculados con 1 gramo de levadura, pasado el tiempo de incubación, fueron lavados para eliminar el exceso de levaduras, se tomó

una alícuota de 2 mL que fue fijada en solución fijadora de glutaraldehído (25%) diluido en cacodilato de sodio (1:9). Una vez fijadas, las muestras fueron procesadas y observadas a través de microscopía electrónica de barrido.

Conteo de levaduras asimiladas por los metanauplios de Artemia

Adicionalmente fue realizado el conteo de levaduras incorporadas en los metanauplios para saber cuántas unidades formadoras de colonias (UFC) están presentes en los metanauplios. Para eso fue realizado el protocolo descrito anteriormente. Una vez inoculados y lavados con agua marina, fueron separados 100 metanauplios, lavados (3 veces) con amortiguador de fosfatos salino (PBS) estéril (pH 7,4) e inoculados en Eppendorf de 1,5 mL con 1 mL de PBS estéril. Luego la muestra fue macerada con pistilo estéril. Las diluciones fueron de 1:1, 1:10 y 1:100 y control (PBS estéril). Fueron inoculadas 100 μ L de cada dilución en placas de Petri con medio YPD sólido. Las placas de Petri fueron incubadas a 30° por 48 horas. Pasadas las 48 horas, fue realizado el conteo de las UFC de cada placa.

Obtención de huevos y larvicultura de *Seriola rivoliana*

Los huevos de *S. rivoliana* fueron obtenidos de la empresa Kampachi Farms. Los huevos fertilizados fueron transferidos a tanques de incubación con volumen de 100 L con suministro de aire y oxígeno puro a una densidad de huevos de 1400 huevos L⁻¹ con recambio de 800%. Una vez eclosionadas, las larvas fueron transferidas a los tanques de larvicultura de 500 L cada, a una densidad de 80 larvas L⁻¹.

La temperatura de cultivo fue de 22.97 \pm 0.32 °C, concentración de oxígeno disuelto de 6.79 \pm 0.75 mg L⁻¹ y salinidad de 37.0 \pm 1.0 g L⁻¹. El fotoperiodo utilizado fue de 24 horas desde la incubación hasta el día 9; del día 9 al día 14 el fotoperiodo fue de 18 horas y del día 15 en adelante, fotoperiodo de 13 horas. El recambio de agua inició al día 5 con 20% de recambio aumentando progresivamente hasta 600% al día 30.

Las larvas fueron alimentadas del día 2 al día 18 con rotíferos (*Brachionus* sp.) enriquecidos, en sistema de agua verde con microalga viva *N. oculata* a una densidad de 0.5 x 10⁶. Del día 12 al 15 se proporcionaron nauplios de *Artemia* recién eclosionados y a partir del día 15, metanauplios enriquecidos con Ori-Green® (Skreting, Stavanger, Norway). A partir del día 18 se introdujo el alimento comercial Otohime (Reed Mariculture, Campbell, USA) con la siguiente composición: 56.3% proteína, 15.9% lípidos y 13.5% cenizas.

Enriquecimiento de alimento vivo

Los rotíferos fueron cosechados de sus tanques de cultivo, lavados con agua de mar filtrada y concentrados en hieleras, donde fueron enriquecidos con enriquecedor comercial Ori-green por 2 horas a la razón de $0.25 \text{ g} \times 10^6$ rotíferos, luego cosechados y lavados para la adecuada eliminación del enriquecedor. Una parte fue proporcionada al momento para las larvas y otra parte fue reacondicionada en hieleras con botellas pet rellenas de hielo para bajar la temperatura ($4\text{-}10 \text{ }^\circ\text{C}$), disminuyendo el metabolismo de los rotíferos para que éstos puedan mantener su calidad por hasta 6 horas, garantizando las posteriores alimentaciones.

Exclusivamente para el tratamiento con levadura, mitad de los rotíferos fueron enriquecidos con enriquecedor comercial y la otra mitad fue enriquecida con levadura de la siguiente manera: los rotíferos fueron cosechados del estanque de cultivo, filtrados y lavados con agua de mar filtrada, una vez limpios y concentrados en una cubeta con aireación, fue agregada levadura a la razón de $1 \text{ g} \times 10^6$ de rotíferos. Se incubaron por 15 minutos para que los rotíferos encapsularan la levadura, pasado el tiempo, los rotíferos fueron lavados, filtrados, concentrados y distribuidos a los estanques de larvicultura. El enriquecimiento con la levadura también se realizó con la *Artemia* en la misma proporción (50% emulsión comercial: 50% levadura). La incubación con metanauplios de *Artemia* fue de 45 minutos, como se ha mencionado en la sección anterior.

Resultados

Una vez observado en microscopia de fluorescencia el alimento vivo incubado en diferentes tiempos se pudo concluir que, el período de incubación más adecuado para el rotífero fue de 15 minutos y para los metanauplios de *Artemia* el período fue de 45 minutos (Fig. 4). Cabe mencionar que, a pesar de que en los períodos inferiores hubo presencia de levadura en el tracto del alimento vivo, apenas al minuto 15 y 45 en rotíferos y *Artemia*, respectivamente, fue cuando se pudo observar el tracto del alimento vivo casi completo de levadura y pasado este tiempo, se pudo observar el inicio de su deposición.

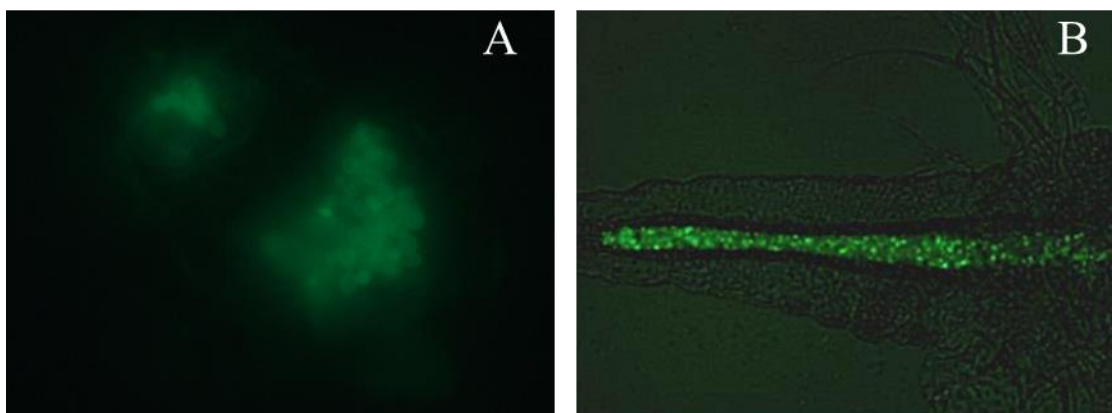


Figura 4: Incorporación de la levadura marcada con DTAF en alimento vivo. A) rotífero (15 minutos de incubación); B) metanauplio de *Artemia* (45 minutos de incubación).

La microscopía electrónica reveló que tanto los rotíferos como los metanauplios mantienen las levaduras vivas e íntegras (Fig. 5 y 6), sin que estas sean digeridas por el alimento vivo. Además, se pudo observar que la levadura también se adhiere al exterior de los rotíferos y metanauplios de *Artemia*

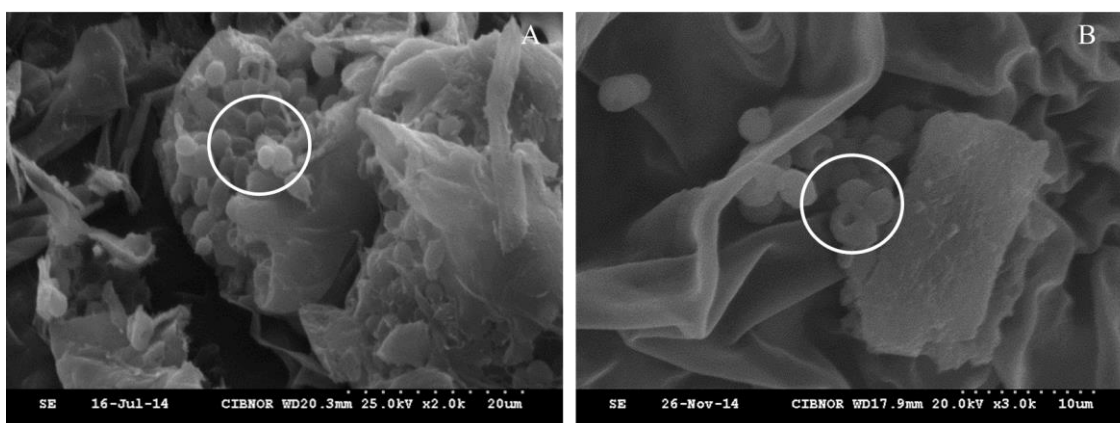


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido. Fractura de rotífero. A) Levaduras adheridas al tracto de rotífero y B) levaduras adheridas en la parte externa del rotífero.

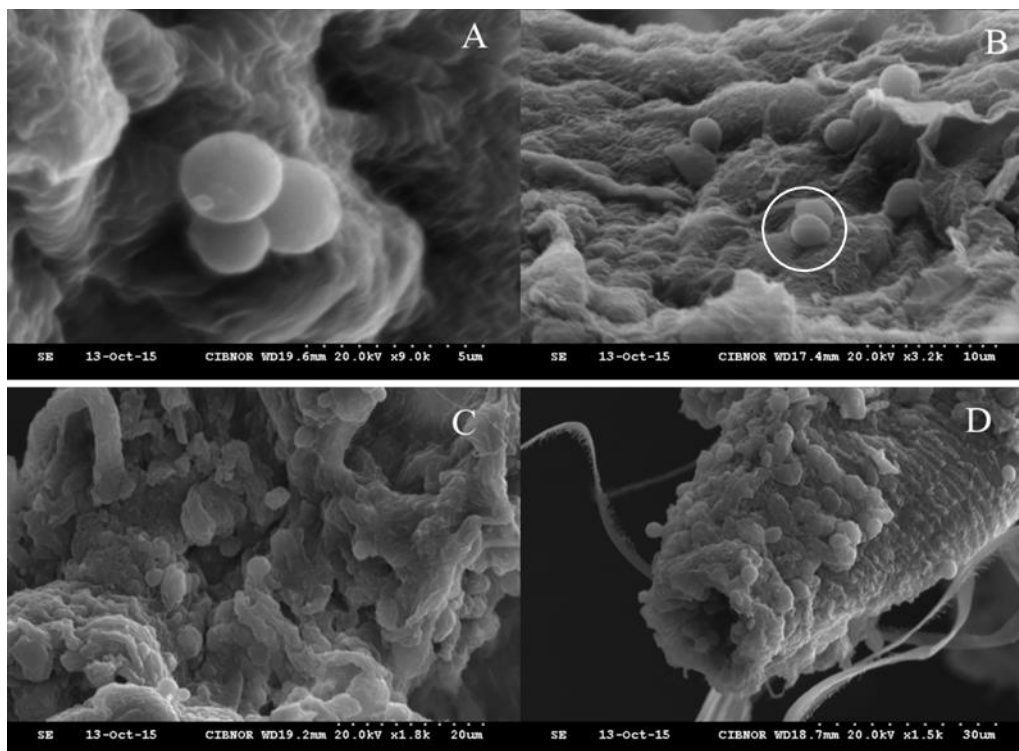


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido. Fractura de *Artemia*. Levaduras adheridas al tracto de *Artemia* (A, B y C) y levaduras adheridas en la parte externa (D).

Para saber cuál fue la cantidad de levadura acarreada por cada metanauplio, se realizó el conteo en placas Petri con medio YPD agar. En la dilución 1:1 resultó en 9020 UFC/mL, la dilución 1:10 resultó en 1230 UFC/mL, la dilución 1:100 resultó en 130 UFC/mL, lo que nos lleva a la conclusión de que cada metanauplio de *Artemia* es capaz de acarrear aproximadamente 100 UFC de levaduras a la larva.

En el análisis de microscopía electrónica de barrido de larvas, se pudo observar la presencia de levaduras intactas en el tracto digestivo de *S. rivoliana* (Fig. 7), lo que nos indica que el alimento vivo fue capaz de llevar estas levaduras intactas al tracto digestivo de las larvas. De igual manera, las levaduras fueron recuperadas viables, mediante su cultivo en agar YPD durante 24 h, a 30°C.

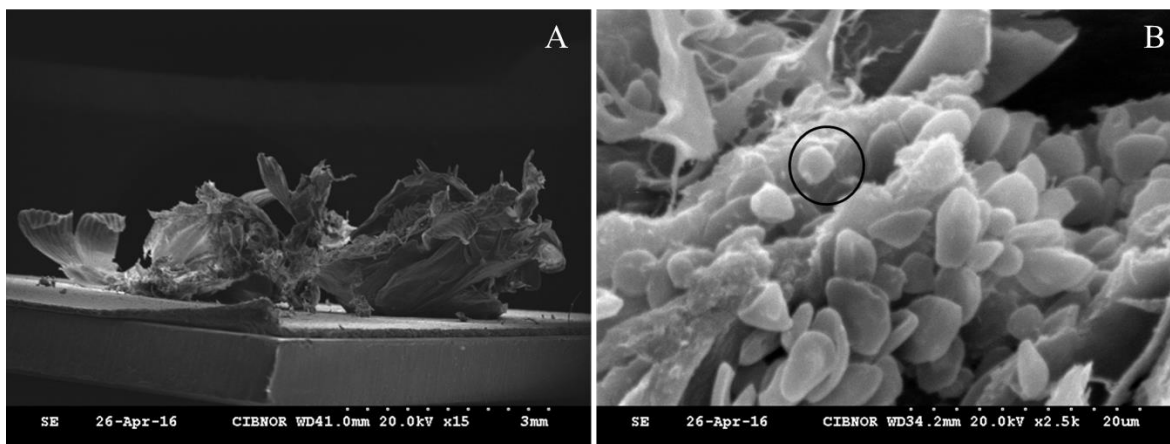


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido de larvas de *Seriola rivoliana* al 30 DDE. A) Larva fracturada; B) presencia de levadura viva en el interior de la larva.

Los resultados obtenidos en los experimentos demostraron el efecto probiótico de la levadura *D. hansenii* sobre el crecimiento, supervivencia, maduración del tracto digestivo, reducción en la incidencia de deformidades esqueléticas y cambios en la morfología del tracto digestivo de las larvas de *S. rivoliana* (datos no publicados).

Discusión

Las larvas de peces marinos generalmente no se alimentan de dieta artificial durante los primeros estadios de desarrollo y requieren de alimento vivo (Picchiatti *et al.*, 2007; Loh *et al.*, 2021), además la alimentación con alimento vivo ofrece una posibilidad de utilización como vectores que permiten que la comunidad bacteriana del hospedero sea modificada a través de la adición de probióticos (Vine *et al.*, 2006). La *Artemia* y el rotífero son adecuados para la utilización como vectores por poseer un comportamiento alimentario no selectivo y, por ser el primer alimento de larvas de peces, estos pueden transferir los beneficios del probiótico al hospedero en las primeras etapas de desarrollo. Se pudo verificar que *Artemia* y rotífero son buenos vectores de la levadura *D. hansenii*, y puede acarrear grandes cantidades de ésta al hospedero. La utilización del alimento vivo como vector de probióticos es ampliamente utilizada en la piscicultura. Gatesoupe (1994) utilizó el rotífero *B. plicatilis* como vector de BAL para verificar la resistencia de *S. maximus* contra *Vibrio* patógenas, una cepa de BAL fue cultivada e introducida diariamente para enriquecer al rotífero, a una razón de 4×10^5 UFC/mL. Una vez infectada la larva, esta tuvo supervivencia de 53% cuando

comparada a 8% del tratamiento sin probiótico. Loh *et al.* 2021 utilizaron la *Artemia* como vector de *Lactobacillus lactis* y alginato de sodio para larvas de la perca *Anabas testudineus* y obtuvieron como resultado hasta el 50% de supervivencia en los tratamientos con la *Artemia* enriquecida con el probiótico cuando comparada con el tratamiento control (20% de supervivencia), estos resultados demuestran la capacidad de la *Artemia* como vector de aditivos funcionales sin comprometimiento de la estructura y función de estos.

Carnevali *et al.* (2006) utilizaron rotíferos y *Artemia* como vectores del probiótico *L. delbrueckii* pudieron comprobar la eficiencia de estos vectores donde los tratamientos que recibieron el probiótico tenían un conteo de 4.35-5.68 log UFC/g de larva mientras que en el grupo control presentaban 0.45 log UFC/g de larva. Un punto importante que llevarse en cuenta es el período de incubación. Picchiatti *et al.* (2007) utilizaron dos cepas de bacterias ácido lácticas *L. fructivorans* y *L. plantarum*, a una concentración total de 10^5 bacteria mL^{-1} y luego incubadas por 15 minutos con el alimento vivo (rotíferos y *Artemia*). El tiempo de incubación corrobora con el presente estudio donde al incubar los rotíferos *B. rotundiformis* con *D. hansenii* observamos que 15 minutos era el tiempo adecuado una vez que pasado ese período el rotífero ya empezaba con la deposición. Dehghan *et al.* 2011 utilizaron períodos de incubación de *S. cerevisiae* en *Artemia* de 5, 10 y 24 horas. Patra *et al.* (2003) utilizaron 24 horas para enriquecer *Artemia* con *S. boulardi* y pudo observar que concentraciones superiores a 10^4 UFC mL^{-1} la supervivencia del metanauplii era muy baja debido al carácter contaminante del medio enriquecido, para mitigar el problema proporcionaron el enriquecimiento en dos raciones. Otros trabajos han utilizado diferentes tiempos de incubación del probióticos (8-48 horas) (Iranshahi *et al.*, 2012; Touraki *et al.*, 2012; Loh *et al.*, 2021). Eso demuestra la importancia de identificar y determinar el tiempo y cantidad adecuados de enriquecimiento. En el presente trabajo se pudo constatar que con tiempos más cortos se tiene una buena asimilación de la levadura por parte del alimento vivo, así mismo como Rousseau (2013), que verificó el tiempo de incubación de la levadura *D. hansenii* en *B. plicatilis* y metanauplios de *Artemia*, en el cual concluyó que para el *B. plicatilis* el tiempo ideal de incubación fue de 30 minutos. Este tiempo fue superior al tiempo observado en ese trabajo, eso debido a que 30 minutos fue el tiempo mínimo de incubación utilizado por Rousseau (2013), sin embargo, una vez pasados los 30 minutos la concentración de levaduras fue reducida de manera acentuada, mismo patrón observado en el presente trabajo. Para

Artemia obtuvo resultado satisfactorio a los 30 minutos, luego una caída de la concentración de levaduras a los 60 minutos con una recuperación de la concentración de células a las 4 horas de enriquecimiento. Este valor también difiere del presente trabajo, donde la concentración ideal fue alcanzada a los 45 minutos, seguida de deposición de la levadura. El hecho de que los tiempos de incubación de este trabajo y del trabajo de Rousseau (2013) sean diferentes, puede deberse a los intervalos aplicados para observar la incubación, donde en el presente trabajo los intervalos fueron cortos, no superior a los 15 minutos, en el trabajo de Rousseau los intervalos fueron de 30 y 60 minutos. Vázquez-Silva *et al.* (2016; 2017) incubaron metanauplios de *Artemia* con diferentes cepas de bacterias ácido lácticas para larvas de *Chirostoma humboldtianum* y *Chirostoma jordani* por un período de 40 minutos y pudieron observar mayor supervivencia, mayor crecimiento y ganancia en peso en larvas tratadas con las bacterias probióticas en relación con el control. Estos resultados comprueban que un tiempo corto de incubación es eficiente para enriquecer el alimento vivo. Cabe resaltar que un período corto de incubación facilita el manejo en el cultivo larvario.

Además del tiempo y la concentración de la levadura incubada, es necesario saber si la integridad del probiótico se mantiene una vez incorporado por el alimento vivo. Dehghan *et al.* (2011) sugieren que las células de levadura pueden ser indigeribles por los metanauplios, lo cual fue posible comprobar en el presente trabajo, ya que a través de la microscopía electrónica se pudo verificar que la levadura permanece intacta en el tracto del rotífero y *Artemia*. Dehghan *et al.* (2011) observaron que una vez que los metanauplios fueron retirados de la suspensión de levadura, hubo una rápida disminución en la cantidad de células, esta disminución puede deberse a la eliminación de la levadura después de lavar y pasar al agua de mar estéril. Los autores sugieren que la levadura detectada es la que colonizó el interior del tracto y la que se adhirió a la superficie exterior de los metanauplios, lo que corrobora con el presente estudio que identifica una gran cantidad de levaduras adheridas al exterior principalmente de los metanauplios.

Conclusiones

Se pudo concluir que los rotíferos y *Artemia* pueden actuar como vector de la levadura *D. hansenii*, capaz de transportar la levadura viva a las larvas de los peces, permitiendo la colonización del tracto digestivo desde etapas muy tempranas. Se sugiere para futuras

investigaciones, identificar la influencia de la levadura sobre la modulación de la microbiota intestinal durante la ontogenia inicial de larvas de peces marinos y su relación con la maduración del tracto digestivo e incidencia de deformidades esqueléticas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa Kampachi Farms por las facilidades en la obtención de huevos y embriones para la realización de los experimentos; a la Biol. Patricia Hinojosa Baltazar, B.M. Jorge Sandoval Soto, Dr. Marcos Quiñones Arreola, M.C. Pablo Monsalvo Spencer, Delfino Barajas, Pablo Ormart y Ariel Cruz por el apoyo técnico otorgado.

Referencias

- Andlid, T., Juárez, R.V., Gustafsson, L., 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microb. Ecol.* 30, 321-24
- Angulo, C, Maldonado, M., Delgado, K., Reyes-Becerril, M. (2017) *Debaryomyces hansenii* up regulates superoxide dismutase gene expression and enhances the immune response and survival in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes after *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Dev Comp Immunol* 71, 18-27
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Medina-Córdova, N., Tovar-Ramírez, D., & Angulo, C. (2020). Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(8), 7689–7699. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10780-z>
- Balcázar, J. L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114(3), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Borges, N., Keller-Costa, T., Sanches-Fernandes, G. M. M., Louvado, A., Gomes, N. C. M., & Costa, R. (2020). *Annual Review of Animal Biosciences Bacteriome Structure, Function, and Probiotics in Fish Larviculture: The Good, the Bad, and the Gaps*. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-062920>
- Breuer, U., Harms, H., 2006. *Debaryomyces hansenii*: an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23, 415–437.
- Burgoin, M.C. 2015. Estudio de la Incorporación de la levadura viva *Debaryomyces hansenii* a través del rotífero *Brachionus plicatilis* durante los primeros días de desarrollo del jurel *Seriola rivoliana*. Tesis (Maestría en Ciencias). La Paz, México. Programa de Posgrado del Cibnor. 87 p.
- Buzzini, P., Vaughan Martini, A. (2006) Yeast biodiversity and biotechnology. In: Rosa C, Péter G eds. *The Yeast Handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, Berlín, pp 533-559
- Carnevali O, Maradonna F, Gioacchini G. (2017) Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture* 472:144-155. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.037>
- Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., Cresci, A., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258,430-438.
- Ceseña, C. E., Vega-Villasante, F., Aguirre-Guzman, G., Luna-González, A., & Campa-Córdova, Á. I. (2021). Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: A minireview. *International Aquatic Research* 13, 1–16. <https://doi.org/10.22034/iar.2021.1904524.1066>
- Cross, M.L. (2002) Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 245-253
- Dehghan, M., Jafariyan, H., Rezai, H., Amoozagar, M. A., & Sahandi, J. (2011). Potential of Brine Shrimp (*Artemia urmiana*) Enrichment with Two Species of Bacillus and Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 3(6), 523–528.

- Donzella, S., Capusoni, C., Pellegrino, L., & Compagno, C. (2021). Bioprocesses with Reduced Ecological Footprint by Marine *Debaryomyces hansenii* Strain for Potential Applications in Circular Economy. *Journal of Fungi*, 7(12), 1028. <https://doi.org/10.3390/jof7121028>
- Donzella, S., Capusoni, C., Pellegrino, L., & Compagno, C. (2021). Bioprocesses with Reduced Ecological Footprint by Marine *Debaryomyces hansenii* Strain for Potential Applications in Circular Economy. *Journal of Fungi*, 7(12), 1028. <https://doi.org/10.3390/jof7121028>
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147:165
- Gatesoupe, F.J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic Vibrio. *Aquat. Living Res.*, 7, 277–282.
- Guzmán-Villanueva, L., D. Tovar-Ramírez, R. Civera-Cerecedo. 2007. Effect of wild and ornithine decarboxylase deficient *Debaryomyces hansenii*, on *Paralabrax maculatofasciatus* larvae development. Caribbean and Latin American Aquaculture; 6–9 Noviembre; San Juan Puerto Rico.
- Hasan, K. N., & Banerjee, G. (2020). Recent studies on probiotics as beneficial mediator in aquaculture: a review. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. <https://doi.org/10.1186/s41936-020-00190-y>
- Huyben, D., Sun, L., Moccia, R., Kiessling, A., Dicksved, J., & Lundh, T. (2018). Dietary live yeast and increased water temperature influence the gut microbiota of rainbow trout. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1377–1392. <https://doi.org/10.1111/jam.13738>
- Ishthiaq, I. B., Ahmed, J., & Ramalingam, K. (2021). Probiotics in brackish water fish farming: A special focus on encapsulated probiotics. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11(6), 14697–14708. <https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1469714708>
- Krogdahl, A., Sundby, A., 1999. Characteristics of pancreatic function in fish. In: Pierzynowski, S.G., Zabielski, R. Eds., *Biology of the Pancreas in Growing Animals*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 437-458
- Loh, J. Y., Chan, H. K., Yam, H. C., In, L. L. A., & Lim, C. S. Y. (2020). An overview of the immunomodulatory effects exerted by probiotics and prebiotics in grouper fish. In *Aquaculture International* 28(2), 729–750. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00491-2>
- Navarrete, P., & Tovar-Ramrez, D. (2014). Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture. *Sustainable Aquaculture Techniques*. InTech. <https://doi.org/10.5772/57196>
- Picchietti, S., Fausto, A.M., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A.R., Buonocore, F., Scapigliati, G., Abelli, L. (2009). Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T- cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shell Immunol* 26, 368–376
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, 33(10), 523–533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>
- Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Angulo, M., & Esteban, M. Á. (2021). Probiotic properties of *Debaryomyces hansenii* BCS004 and their immunostimulatory effect in supplemented diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Research*, 52(6), 2715–2726. <https://doi.org/10.1111/are.15123>

- Reyes-Becerril, M., M.A. Ángeles Esteban, D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle. 2011. Polyamine determination in different strains of the yeast *Debaryomyces hansenii* by high pressure liquid chromatography. *Food Chem* 127, 1862-5
- Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F., & Esteban, M. Á. (2008). Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 25(6), 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.010>
- Roo, J., Fernández-Palacios, H., Hernández-Cruz, C.M., Mesa-Rodriguez, A., Schuchardt, D., Izquierdo, M., 2014. First results of spawning and larval rearing of longfin yellowtail *Seriola rivoliana* as a fast-growing candidate for European marine finfish aquaculture diversification. *Aquac Res* 45, 689–700
- Rousseau, M. 2013. Enrichment of rotifers (*Brachionus plicatilis*), *Artemia* nauplii and artificial dry feed with live yeast (*Debaryomyces hansenii*) for the growth of cultured dusky kob (*Argyrosomus japonicus*) larvae. Tesis de Maestría. Universidad de Ciudad del Cabo.
- Samat, N. A., Yusoff, F. M., Rasdi, N. W., & Karim, M. (2020). Enhancement of live food nutritional status with essential nutrients for improving aquatic animal health: A review. *Animals* 10(12) 1–27. <https://doi.org/10.3390/ani10122457>
- Schepper J.D. et al. (2017) Probiotics in Gut-Bone Signaling. In: McCabe L., Parameswaran N. (eds) Understanding the Gut-Bone Signaling Axis. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1033. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66653-2_11
- Sen, S., & Mansell, T. J. (2020). Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. In *Fungal Genetics and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103333>
- Teles, A., Salas-Leiva, J., Alvarez-González, C. A., Gisbert, E., Ibarra-Castro, L., Pérez-Urbiola, J. C., Tovar-Ramírez, D., 2017. Histological study of the gastrointestinal tract in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 43(6), 1613-1628. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0397-5>
- Teles, A., Salas-Leiva, J., Alvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., 2019. Changes in digestive enzyme activities during early ontogeny of *Seriola rivoliana*. *Fish Physiol. Biochem.* 45(2), 733-742. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0598-6>
- Touraki, M., Karamanlidou, G., Karavida, P., Chrysi, K. (2012) Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia* nauplii against vibriosis. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 2425–2433. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1052-z>
- Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J.F., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J. L. (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 300, 142-147.
- Tovar-Ramírez, D., Reyes-Becerril, M.C., Guzmán-Villanueva, L., Gleaves- López, V., Civera-Cerecedo, R., Ascencio-Valle, F., Gracia-López, V., Barbosa- Solomieu, V., Gisbert-Casas, E., Andree, K. B., Alvarez-González, C. A., Moyano-López, F.J., Ortíz-Galindo, J.L., Hinojosa-Baltazar, P., Gutiérrez-Rivera, J. N., Millán-Martínez, A. A. y Linares-Aranda, M. (2008) Probióticos en Acuicultura: Avances Recientes del

- Uso de Levaduras en Peces Marinos. 237- 257 pp. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Juan Pablo Lazo y Ma. Teresa Viana. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino Infante, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., & Vázquez-Juárez, R. (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, 234(1–4), 415–427. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.028>
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez- Juárez, R., Lésel R., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204, 113–123.
- Vargas, O., Gutiérrez, M. S., Caruffo, M., Valderrama, B., Medina, D. A., García, K., Reyes-Jara, A., Toro, M., Feijóo, C. G., & Navarrete, P. (2021). Probiotic Yeasts and *Vibrio anguillarum* Infection Modify the Microbiome of Zebrafish Larvae. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.647977>
- Vargas-Albores, F., Martínez-Córdova, L. R., Hernández-Mendoza, A., Cicala, F., Lago-Lestón, A., & Martínez-Porchas, M. (2021). Therapeutic modulation of fish gut microbiota, a feasible strategy for aquaculture? In *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737050>
- Vázquez-Silva, G., Castro-Mejía, J., Sánchez de la Concha, B., González-Vázquez, R., Mayorga-Reyes, L., Azaola-Espinosa, A. (2016) Bioencapsulation of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus johnsonii* in *Artemia franciscana* as feed for charal (*Chirostoma jordani*) larvae. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15(3), 809-818.
- Vázquez-Silva, G., Ramírez-Saad, H. C., Aguirre-Garrido, J. F., Mayorga-Reyes, L., Azaola-Espinosa, A., & Morales-Jiménez, J. (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. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue5-fulltext-18>
- Vincent, A. T., Gauthier, J., Derome, N., & Charette, S. J. (2019). The Rise and Fall of Antibiotics in Aquaculture. *Microbial Communities in Aquaculture Ecosystem*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16190-3_1
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 404-427
- Wuertz, S., Schroeder, A., & Wanka, K. M. (2021). Probiotics in fish nutrition—long-standing household remedy or native nutraceuticals? *Water*. <https://doi.org/10.3390/w13101348>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B.A., Arockiaraj, J. (2020) Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture* 12(3), 1903-1927.