



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO GENÓMICO Y CARACTERIZACIÓN DE *Bacillus safensis* BS1-A Y BS1-B, Y SU USO POTENCIAL EN EL CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*).

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

María Alejandra Liñán Vidriales

La Paz, Baja California Sur, junio de 2026.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las **15:54** horas del día **23** del mes de **abril** del año **2026**, se procedió por las personas abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"ESTUDIO GENÓMICO Y CARACTERIZACIÓN DE *Bacillus safensis* BS1-A Y BS1-B, Y SU USO POTENCIAL EN EL CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*)"






Presentada por la alumna:

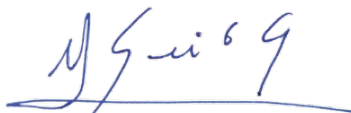
María Alejandra Liñan Vidriales

Aspirante al Grado de DOCTORADO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones las personas integrantes de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Grado y nombre	Estatus	Firma
Dr. Alberto Peña Rodríguez	Co-Director de Tesis	
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán	Co-Director de Tesis	
Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola	Co-Tutora	
Dra. Martha Guadalupe Nieto López	Co-Tutora	
Dra. Norma Angelica Ochoa Alvarez	Co-Tutora	



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos



La Paz, Baja California Sur, a 05 de Mayo de 2026.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante María Alejandra Liñán Vidriales del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio: iThenticate
- Filtros utilizados: Bibliografía, Texto citado, Texto mencionado
- Porcentajes de similitud: 16% de similitud general
Se muestra captura de pantalla

✓ iThenticate[®] | Página 2 de 114 - Descripción general de integridad

16% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado

Fuentes principales

- 15% Fuentes de Internet
- 6% Publicaciones
- 0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

- Caracteres reemplazados**
182 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos buscan incidencias advertidas
Una marca recomendada

Director-Co/Directores

Dr. Alberto Peña Rodríguez

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Estudiante

María Alejandra Liñán Vidriales

Personal técnico de asesoría en el análisis

Nombre y Firma

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dra. Norma Angélica Ochoa Álvarez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dra. Martha Guadalupe Nieto López
Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dra. Norma Angélica Ochoa Álvarez
Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Dra. Martha Guadalupe Nieto López

Jurado de Examen

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dra. Norma Angélica Ochoa Álvarez
Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Dra. Martha Guadalupe Nieto López

Suplentes

Dra. Regina Elizondo González
Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva

Resumen

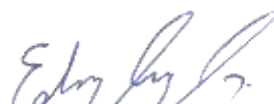
El género *Bacillus* comprende bacterias Gram positivas ampliamente utilizadas en acuicultura como probióticos en el agua de cultivo, aditivos alimenticios y agentes de fermentación para incrementar el valor nutricional de ingredientes de origen vegetal. Por su parte, el camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei*, representa una de las especies de mayor importancia para la acuicultura mundial. En este estudio se evaluaron dos morfotipos de *Bacillus safensis*, denominados BS1-A y BS1-B, aislados de esponjas marinas, con el objetivo de determinar su potencial biotecnológico en el cultivo de camarón. Ambos morfotipos fueron caracterizados mediante análisis genómicos, pruebas bioquímicas, antagonismo bacteriano, producción enzimática y bioensayos de supervivencia en *Artemia franciscana*. Posteriormente, se evaluó in vivo el desempeño productivo de camarones alimentados o expuestos a *Bacillus safensis* mediante tres estrategias: 1) adición en la columna de agua, 2) suplementación directa en el alimento y 3) predigestión fermentativa de dietas formuladas con macroalgas. Los resultados mostraron que ambos morfotipos presentaron actividad antagonista frente a bacterias del género *Vibrio*. El morfotipo BS1-A inhibió a *V. parahaemolyticus*, *V. diabolicus* y *V. harveyi*, mientras que BS1-B mostró actividad contra *V. diabolicus* y *V. harveyi*. Además, ambos morfotipos demostraron capacidad para producir proteasas y celulasas, crecer en condiciones anaerobias, metabolizar diversas fuentes de carbono y tolerar amplios rangos de salinidad (0–6 %) y temperatura (15–45 °C). El análisis genómico reveló un tamaño de genoma de 3.68 Mb y una identidad ANI de 99.9 % entre ambos morfotipos, así como 97.46 % respecto a la cepa de referencia PgKB20. En los bioensayos con *Artemia*, ninguno de los morfotipos afectó el proceso de eclosión. Las evaluaciones in vivo demostraron que la adición de *Bacillus safensis* en el agua de cultivo (2.5×10^7 UFC L⁻¹) incrementó significativamente la ganancia de peso y mejoró el factor de conversión alimenticia de los camarones en comparación con el grupo control. Asimismo, esta estrategia redujo significativamente la concentración de amonio en el agua. En contraste, la inclusión de *Bacillus safensis* en el alimento (5×10^7 UFC g⁻¹) o mediante predigestión fermentativa (6×10^7 UFC g⁻¹) no generó diferencias significativas en el rendimiento productivo respecto al control. Sin embargo, el uso de macroalgas como sustituto parcial de trigo y sorgo en la formulación del alimento incrementó significativamente la actividad amilasa, evidenciando su potencial como ingrediente funcional en dietas para camarón. En conclusión, aunque la suplementación directa y la predigestión del alimento no produjeron mejoras significativas en el crecimiento del camarón, la aplicación de *Bacillus safensis* en el agua de cultivo mejoró el desempeño zootécnico, la eficiencia alimenticia y la calidad del agua, destacando su potencial como herramienta biotecnológica para promover una acuicultura más sostenible y rentable.

Palabras clave: *Bacillus safensis*, *Penaeus vannamei*, Genómica bacteriana, Probiótico

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5652-2612>



Vo.Bo. Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director de Tesis



Vo.Bo Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis

Summary

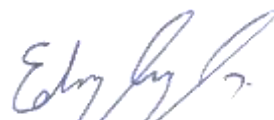
The genus *Bacillus* comprises Gram-positive bacteria widely used in aquaculture as probiotics in culture water, feed additives, and fermentation agents to enhance the nutritional value of plant-based ingredients. Meanwhile, the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, is one of the most important species in global aquaculture. In this study, two morphotypes of *Bacillus safensis*, designated BS1-A and BS1-B and isolated from marine sponges, were evaluated for their biotechnological potential in shrimp farming. Both morphotypes were characterized through genomic analyses, biochemical assays, bacterial antagonism tests, enzymatic activity evaluations, and survival bioassays using *Artemia franciscana*. Subsequently, in vivo trials were conducted to evaluate shrimp performance using three application strategies: 1) addition of *Bacillus safensis* to the culture water, 2) direct supplementation in feed, and 3) feed predigestion through fermentation of macroalgae-based diets. The results showed that both morphotypes exhibited antagonistic activity against pathogenic bacteria of the genus *Vibrio*. Morphotype BS1-A inhibited *V. parahaemolyticus*, *V. diabolicus*, and *V. harveyi*, whereas BS1-B showed inhibitory activity against *V. diabolicus* and *V. harveyi*. In addition, both morphotypes demonstrated the ability to produce proteases and cellulases, grow under anaerobic conditions, metabolize diverse carbon sources, and tolerate broad ranges of salinity (0–6%) and temperature (15–45 °C). Whole-genome sequencing revealed a genome size of 3.68 Mb, with an ANI value of 99.9% between both morphotypes and 97.46% compared with the reference strain PgKB20. In *Artemia* bioassays, neither morphotype negatively affected the hatching process. In vivo shrimp culture evaluations demonstrated that the addition of *Bacillus safensis* to the culture water (2.5×10^7 CFU L⁻¹) significantly increased weight gain and improved feed conversion ratio compared with the control group. Likewise, this treatment significantly reduced ammonia concentration in the culture water. In contrast, dietary supplementation with *Bacillus safensis* (5×10^7 CFU g⁻¹) or feed predigestion through fermentation (6×10^7 CFU g⁻¹) did not produce significant differences in shrimp growth performance relative to the control. However, the inclusion of macroalgae as a partial replacement for wheat and sorghum in feed formulation significantly increased amylase activity, highlighting its potential as a functional ingredient in shrimp diets. In conclusion, although direct dietary supplementation and feed predigestion did not significantly improve shrimp growth performance, the application of *Bacillus safensis* in culture water enhanced zootechnical performance, feed efficiency, and water quality, demonstrating its potential as a biotechnological tool for promoting a more sustainable and profitable shrimp aquaculture industry.

Keywords: *Bacillus safensis*, *Penaeus vannamei*, Bacterial Genomics, Probiotic

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5652-2612>



Vo.Bo. Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director de Tesis



Vo.Bo Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

A mi esposo, por ser mi lugar seguro, mi fuerza en los días difíciles y mi compañero en cada paso de este camino.

A mis padres y hermanos, por su amor incondicional, por creer en mí y acompañarme siempre.

Y a Balam, mi hijo, junto a mis angelitos que ahora viven en el cielo. Aunque ya no estén aquí, los llevo conmigo todos los días, en mi corazón y en cada logro de mi vida.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR), por permitirme realizar mis estudios de posgrado; y a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por el apoyo económico otorgado mediante la beca de Doctorado No. 853824.

A mis co-directores, el Dr. Alberto Peña Rodríguez y el Dr. Eduardo Quiroz Guzmán, por su guía, paciencia y apoyo a lo largo de este trabajo. Gracias por compartir conmigo sus conocimientos y por acompañarme durante este proceso de formación académica y personal.

A mis Co-Tutoras, la Dr. Norma Angelica Ochoa Álvarez, Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola y Dra. Martha Guadalupe Nieto López, gracias por sus observaciones, consejos y disposición para enriquecer este trabajo.

Agradezco profundamente la colaboración y apoyo brindado por Sandra De La Paz Reyes y Gabriel Robles Villegas (Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola); Roberto Hernández Herrera (Laboratorio de Bioquímica Fisiológica); Sindi Areli Juan Antunez (Laboratorio de Análisis Químico Proximal); Dra. Andressa Teles (Laboratorio de Cultivo de Zooplancton); Dr. Jesús Martín Ramírez Orozco (Laboratorio de Inmunogenómica Marina); María de los Ángeles Navarrete del Toro (Laboratorio de Bioquímica); M. en C. Anais Lucía Lucero Olachea y a la Dra. Maribel Maldonado Muñiz (UANL). Gracias por su tiempo, apoyo técnico y disposición para colaborar en este trabajo.

Al personal de la Dirección de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del CIBNOR: Dra. Alejandra Nieto Garibay, Adriana Teresa Franzoni García, Horacio Sandoval Gómez, Fabiola Arellano Romero, Raquel Emilia Herrera Vega, Osvelia Ibarra Morales, Tania Verónica Núñez Valdez y Susana Luna García, gracias por su apoyo, atención y acompañamiento durante esta etapa.

A mis padres y hermanos, gracias por ser mi raíz y mi refugio. Por acompañarme en cada etapa de este camino y por enseñarme el valor del esfuerzo, la sensibilidad y la perseverancia. Todo lo que soy lleva un pedacito de ustedes.

A mi esposo, Rogelio Francisco Romero Hernández, gracias por tu amor, paciencia y apoyo incondicional durante este camino. Gracias por sostenerme en los momentos difíciles, celebrar cada logro y acompañarme durante los bioensayos. Esta tesis también es tuya, porque detrás de cada página siempre encontré en ti un hogar seguro al que volver.

Y a ti, Balam, mi pequeño hijo. Tu paso por mi vida, aunque breve, dejó un amor infinito que me acompaña todos los días. Esta meta también lleva tu luz.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Abreviaturas.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Importancia de la acuicultura y el camarón blanco	5
2.2 Uso de probióticos en la acuicultura.....	6
2.3 <i>Bacillus sp.</i> en acuicultura	8
2.4 Uso de macroalgas en alimento para camarón	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos particulares	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS	16
6.1 Caracterización de <i>Bacillus safensis</i>	16
6.1.1 Aislamiento, conservación e identificación.....	16
6.1.2 Pruebas bioquímicas	16
6.1.3 Determinación cualitativa de actividad de enzimas digestivas	19
6.1.4 Preparación del inóculo y determinación de la curva de crecimiento	20
6.1.5 Ensayo de actividad antagónica mediante la técnica punto-punto (dot-spot)	21
6.2 Análisis genómico.....	22
6.2.1 Secuenciación del genoma completo de las cepas BS1-A y BS1-B	22
6.2.2 Análisis bioinformático.....	22
6.2.3 Efecto de las cepas en la supervivencia de <i>Artemia franciscana</i>	23
6.3 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de la aplicación de <i>Bacillus safensis</i> (en agua de cultivo, alimento y alimento pre-digerido)	24
6.3.1 Evaluación <i>in vivo</i> de BS1-A y BS1-B en el agua de cultivo de camarón.....	24
6.3.2 Elaboración de alícuotas de BS1-A y BS1-B.....	24
6.3.3 Bioensayo de aplicación de BS1-A y BS1-B en el agua de cultivo	24
6.4 Evaluación de los morfotipos BS1-A y BS1-B adicionado en el alimento y su efecto en el cultivo de camarón.....	26
6.4.1 Formulación y elaboración de alimentos.....	26
6.4.2 Bioensayo de crecimiento con camarón.....	29
6.5 Evaluación de <i>Bacillus safensis</i> (BS1-A y BS1-B) en la pre-digestión por fermentación de alimento y su efecto en el cultivo de camarón	29
6.5.1 Formulación y elaboración de alimentos.....	29

6.5.2 Bioensayo de crecimiento con camarón	31
6.5.3 Actividad enzimática digestiva	31
6.5.4 Análisis estadísticos.....	32
7. RESULTADOS.....	33
7.1 Caracterización de las cepas de <i>Bacillus safensis</i>	33
7.2 Aislamiento y caracterización	33
7.2.1 Pruebas bioquímicas	33
7.3 Determinación cualitativa de actividad de enzimas digestivas	36
7.4 Curva de crecimiento de las cepas.....	37
7.5 Ensayo de actividad antagónica mediante la técnica punto-punto (dot-spot).....	38
7.6 Análisis bioinformático de las cepas <i>Bacillus safensis</i> BS1-A y BS1-B.....	39
7.7 Efecto de las cepas en la supervivencia de <i>Artemia salina</i>	41
7.8 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de la aplicación de <i>Bacillus safensis</i> (en agua de cultivo, alimento y alimento pre-digerido)	42
7.8.1 Evaluación <i>in vivo</i> del uso de <i>Bacillus safensis</i> (BS1-A y BS1-B) en el agua de cultivo de camarón.....	42
7.8.2 Análisis proximal de harinas.....	42
7.8.3 Bioensayo de crecimiento con camarón.....	43
7.8.4 Parámetros de calidad del agua.....	45
7.9 Efecto de <i>Bacillus safensis</i> (BS1-A y BS1-B) adicionado en el alimento sobre el cultivo de camarón.....	46
7.10. Uso de <i>Bacillus safensis</i> (BS1-A y BS1-B) en la predigestión por fermentación del alimento y su efecto en el cultivo de camarón	49
7.11 Actividad enzimática digestiva	52
8. DISCUSIÓN.....	57
8.1 Caracterización de actividad enzimática de <i>Bacillus safensis</i>	57
8.2 Pruebas bioquímicas y actividad enzimática.....	57
8.3 Curva de crecimiento de <i>Bacillus safensis</i>	58
8.4 Actividad antagónica de <i>Bacillus safensis</i>	59
8.5 Análisis bioinformático de las cepas	60
8.6 Efecto de las cepas en la supervivencia de <i>Artemia</i>	62
8.7 Efecto de la aplicación de <i>Bacillus safensis</i> en el agua de cultivo de camarón	64
8.8 Efecto de la aplicación de <i>Bacillus safensis</i> en el alimento sobre el cultivo de camarón....	66
8.9 Efecto de la pre-digestión del alimento con <i>Bacillus safensis</i> sobre el cultivo de camarón	68
9. CONCLUSIONES.....	71
10. LITERATURA CITADA	72
11. ANEXOS	86
Anexo A. Artículo Publicado Genomic study and characterization of <i>Bacillus safensis</i> and their potential use in white shrimp (<i>Penaeus vannamei</i>) farming	86
Anexo B. Artículo sometido. Seaweed as a sustainable replacement for terrestrial plant ingredients in shrimp feed	103

Lista de figuras

Figura 1. Curvas de crecimiento de los morfotipos de <i>Bacillus safensis</i> BS1-A y BS1-B durante 48 horas de incubación en medio TSB suplementado con 2.5% de NaCl a 30 °C. Los valores representan la media de tres réplicas biológicas ± desviación estándar.	38
Figura 2. Representación circular del genoma de BS1-A. Desde el anillo externo hacia el centro: comparación BLAST con las secuencias de <i>Bacillus safensis</i> PgKB20 y BS1-B, los genes codificantes de BS1-A, el contenido genómico de G+C y la distribución del sesgo GC del genoma.	40
Figura 3. Análisis del pangenoma de 38 genomas de <i>Bacillus safensis</i> . El árbol filogenético de la izquierda se construyó en RAxML mediante el método de máxima verosimilitud, utilizando el alineamiento de genes núcleo obtenido con Roary. La distribución del pangenoma se visualiza en un mapa de calor, donde las filas corresponden a las cepas del árbol filogenético y las columnas representan grupos ortólogos específicos. La presencia genética se indica en azul y la ausencia se muestra en blanco.....	41
Figura 4. Peso final y ganancia en peso de camarones <i>Penaeus vannamei</i> después de 42 días de bioensayo con bajo recambio de agua y aplicación de bacterias probióticas experimentales (BAC) y comerciales (COM). Las letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos al realizar una prueba de Tukey ($p < 0.05$, $n=4$).....	44
Figura 5. Factor de conversión alimenticia de camarones <i>Penaeus vannamei</i> después de 42 días de bioensayo con bajo recambio de agua y aplicación de bacterias probióticas experimentales (BAC) y comerciales (COM). Las letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos al realizar una prueba de Tukey ($p = 0.030$, $n=4$).	45
Figura 6. Análisis de amonio total (TAN), nitritos, nitratos, fosfatos y total de solidos sedimentables.	46
Figura 7. Promedio peso final y ganancia en peso de camarones <i>Penaeus vannamei</i> después de 29 días alimentados con diferentes fórmulas. Alimento de referencia (C1), Alimento de referencia + <i>Bacillus safensis</i> 5×10^7 CFU g^{-1} (CB), Mezcla de algas (A1), Mezcla de algas digeridas + <i>Bacillus safensis</i> 5×10^7 CFU g^{-1} (AB), Mix de harinas vegetales y algas (M1), Mix de harinas vegetales y algas + <i>Bacillus safensis</i> 5×10^7 CFU g^{-1} (MB). ANOVA de dos vías ($p < 0.05$, $n=3$).....	48
Figura 8. Factor de conversión alimenticia de camarones <i>Penaeus vannamei</i> después de 29 días alimentados con diferentes fórmulas. Alimento de referencia (C1), Alimento de referencia + <i>Bacillus safensis</i> 5×10^7 CFU g^{-1} (CB), Mezcla de algas (A1), Mezcla de algas digeridas + <i>Bacillus safensis</i> 5×10^7 CFU g^{-1} (AB), Mix de harinas vegetales y algas (M1), Mix de harinas vegetales y algas + <i>Bacillus safensis</i> 5×10^7 CFU g^{-1} (MB). ANOVA de dos vías ($p < 0.05$, $n=3$).	49
Figura 9. Promedio peso final y ganancia en peso de camarones <i>Penaeus vannamei</i> después de 42 días alimentados con diferentes fórmulas. C (Alimento de referencia), Cb (Alimento de referencia digerido por <i>Bacillus safensis</i>), A (Mix de algas), Ab (Mix de algas digerido por <i>Bacillus safensis</i>) M (Mix de algas y harinas vegetales) y Mb (Mix de algas y harinas vegetales digerido por <i>Bacillus safensis</i>). ANOVA de dos vías ($p < 0.05$, $n=3$).....	51
Figura 10. Factor de conversión alimenticia de camarones <i>Penaeus vannamei</i> después de 42 días alimentados con diferentes fórmulas. C (Alimento de referencia), Cb (Alimento de referencia digerido por <i>Bacillus safensis</i>), A (Mix de algas), Ab (Mix de algas digerido por <i>Bacillus safensis</i>) M (Mix de algas y harinas vegetales) y Mb (Mix de algas y harinas vegetales digerido por <i>Bacillus safensis</i>). ANOVA de dos vías ($p < 0.05$, $n=3$).....	52

- Figura 11.** Actividad amilasa en el hepatopáncreas de camarones juveniles alimentados con diferentes tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron: C (alimento de referencia), Cb (alimento de referencia pre-digerido por *Bacillus safensis*), A (mix de algas), Ab (mix de algas pre-digerido por *Bacillus safensis*), M (mix de algas y harinas vegetales) y Mb (mix de algas y harinas vegetales pre-digerido por *Bacillus safensis*). Los valores se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA 2 vías seguido de prueba de Tukey considerando la interacción de la formulación con la predigestión con las bacterias, $p = 0.016$).....53
- Figura 12.** Actividad lipasa en el hepatopáncreas de camarones juveniles alimentados con diferentes tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron: C (alimento de referencia), Cb (alimento de referencia pre-digerido por *Bacillus safensis*), A (mix de algas), Ab (mix de algas pre-digerido por *Bacillus safensis*), M (mix de algas y harinas vegetales) y Mb (mix de algas y harinas vegetales pre-digerido por *Bacillus safensis*). Los valores se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA 2 vías $p > 0.05$).54
- Figura 13.** Actividad quimotripsina en el hepatopáncreas de camarones juveniles alimentados con diferentes tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron: C (alimento de referencia), Cb (alimento de referencia pre-digerido por *Bacillus safensis*), A (mix de algas), Ab (mix de algas pre-digerido por *Bacillus safensis*), M (mix de algas y harinas vegetales) y Mb (mix de algas y harinas vegetales pre-digerido por *Bacillus safensis*). Los valores se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA 2 vías $p > 0.05$).55
- Figura 14.** Actividad tripsina en el hepatopáncreas de camarones juveniles alimentados con diferentes tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron: C (alimento de referencia), Cb (alimento de referencia pre-digerido por *Bacillus safensis*), A (mix de algas), Ab (mix de algas pre-digerido por *Bacillus safensis*), M (mix de algas y harinas vegetales) y Mb (mix de algas y harinas vegetales pre-digerido por *Bacillus safensis*). Los valores se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA 2 vías $p > 0.05$).56

Lista de tablas

Tabla 1. Formulación (g kg ⁻¹ dieta) y composición proximal (% base seca).....	28
Tabla 2. Formulación (g kg ⁻¹ dieta) y composición proximal (% base seca).....	30
Tabla 3. Pruebas bioquímicas de las cepas.....	35
Tabla 4. Caracterización morfológica de las cepas.....	36
Tabla 5. Producción de enzimas extracelulares (proteasa, amilasa y celulasa) de las cepas.....	37
Tabla 6. Actividad antagonista de los morfotipos BS1-A y BS1-B frente a tres bacterias patógenas del género <i>Vibrio</i> . DE: Desviación estándar.....	39
Tabla 7. Número de organismos de <i>Artemia franciscana</i> eclosionados después de 24 h con BS1-A.....	42
Tabla 8. Número de organismos de <i>Artemia franciscana</i> eclosionados después de 24 h con BS1-B.....	42
Tabla 9. Análisis proximal de harinas de origen vegetal antes del proceso de valorización.....	43
Tabla 10. Parámetros zootécnicos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia, de camarones <i>Penaeus vannamei</i> después de 42 días con bajo recambio de agua y aplicación de bacterias probióticas experimentales (BAC) y comerciales (COM).	44
Tabla 11. Parámetros zootécnicos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia, de camarones <i>Penaeus vannamei</i> después de 29 días de alimentación con diferentes fórmulas. Alimento de referencia (C1), Alimento de referencia + <i>Bacillus safensis</i> 5x10 ⁷ CFU g ⁻¹ (CB), Mezcla de algas (A1), Mezcla de algas digeridas + <i>Bacillus safensis</i> 5x10 ⁷ CFU g ⁻¹ (AB), Mix de harinas vegetales y algas (M1), Mix de harinas vegetales y algas + <i>Bacillus safensis</i> 5x10 ⁷ CFU g ⁻¹ (MB).	47
Tabla 12. Parámetros zootécnicos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia, de camarones <i>Penaeus vannamei</i> después de 42 días alimentados con diferentes fórmulas. C (Alimento de referencia), Cb (Alimento de referencia digerido por <i>Bacillus safensis</i>), A (Mix de algas), Ab (Mix de algas digerido por <i>Bacillus safensis</i>) M (Mix de algas y harinas vegetales) y Mb (Mix de algas y harinas vegetales predigeridas por <i>Bacillus safensis</i>).....	50

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
AHPND	<i>Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease</i> (enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda)
CMC	Carboximetilcelulosa
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FCA	Factor de conversión alimenticia
g	Gramos
GP	Ganancia en peso
h	hora
kg	kilogramos
L	Litros
M	molar
mg	miligramos
min	Minutos
mL	mililitros
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	nanómetros
p/v	peso/volumen
<i>sp.</i>	<i>species</i> (una especie no especificada dentro de un género)
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i> (indica varias especies dentro de un mismo género)
TC	Tasa de crecimiento
TCE	Tasa de crecimiento específico
TSA	Agar tripticaseína soya
TSS	Total de sólidos sedimentables
UFC	Unidades formadoras de colonias
ups	Unidades prácticas de salinidad
WSSV	<i>White Spot Syndrome Virus</i> (virus del síndrome de la mancha blanca)
µL	microlitros

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la acuicultura se ha intensificado a nivel mundial durante las últimas décadas, consolidándose como uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento. La producción mundial de la pesca y la acuicultura alcanzó 223.2 millones de toneladas, de las cuales la acuicultura contribuyó con aproximadamente 130.9 millones de toneladas, superando por primera vez a la pesca de captura como principal fuente de organismos acuáticos para consumo humano (FAO, 2018). Asimismo, el valor de la producción acuícola mundial se estimó en más de 313 mil millones de dólares, lo que refleja la creciente importancia económica del sector (FAO, 2018). Asia domina la producción global, siendo China, India, Indonesia y Vietnam los principales países productores (FAO, 2018).

Dentro de este sector, el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* representa una de las especies de mayor relevancia económica a nivel mundial. La producción global de camarones peneidos se estimó en 7.9 millones de toneladas en 2022, de las cuales *Penaeus vannamei* representó aproximadamente el 86% del total (FAO, 2024), con una producción superior a 4.5 millones de toneladas y un valor comercial de miles de millones de dólares anuales (Anderson *et al.*, 2017; Boyd *et al.*, 2018).

La intensificación del cultivo, caracterizada por altas densidades de siembra y mayor uso de alimento balanceado, ha incrementado los costos de producción y el riesgo de pérdidas económicas asociadas a brotes de enfermedades y deterioro ambiental (Anderson *et al.*, 2017; Boyd *et al.*, 2018). Sin embargo, la intensificación de los sistemas de cultivo ha traído consigo diversos desafíos, entre ellos, la acumulación de materia orgánica, el deterioro de la calidad del agua y la incidencia de enfermedades infecciosas causadas por bacterias del género *Vibrio* (El-Haroun *et al.*, 2006; Rollo *et al.*, 2006; Godínez-Siordia *et al.*, 2011; Flores-Miranda *et al.*, 2015). Ante estos desafíos, el control de enfermedades bacterianas en acuicultura se ha basado en el uso de antibióticos, pero su aplicación indiscriminada ha ocasionado problemas de resistencia bacteriana y residuos en el ambiente (Defoirdt *et al.*, 2011; Cabello *et al.*, 2016). Debido a esto, en los últimos años se ha promovido el uso de probióticos como una alternativa sostenible y ecológicamente segura. Los probióticos son microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, pueden conferir beneficios al organismo hospedero (FAO/WHO, 2001).

En el ámbito de la acuicultura, los microorganismos destinados a emplearse como probióticos deben cumplir con una serie de criterios estandarizados que garanticen su eficiencia y seguridad (Rahayu *et al.*, 2024).

La selección de cepas apropiadas requiere considerar múltiples características, entre las que se destacan el origen del hospedero, la inocuidad del microorganismo, su capacidad para producir compuestos antimicrobianos, su potencial para modular la respuesta inmunitaria del hospedero y su habilidad para competir de manera eficiente con patógenos en los sitios de adhesión de la mucosa intestinal (Balcázar *et al.*, 2006; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Durante las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado que en el cultivo de camarón los probióticos son capaces de mejorar significativamente el crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia, digestión, respuesta inmune y resistencia a patógenos, además de contribuir a mantener la calidad del agua (Davis, 2005; Zokaeifar *et al.*, 2012; Ringo *et al.*, 2020).

En este contexto *Bacillus* sp. y *Lactobacillus* sp., son los géneros bacterianos más estudiados con potencial probiótico en acuicultura. Particularmente, especies del género *Bacillus* destacan por su capacidad de formar esporas resistentes a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad, permitiéndoles permanecer viables en sistemas de cultivo acuícola (Moriarty, 1997); además, este género es reconocido por producir enzimas extracelulares (amilasa, proteasa, lipasa, celulasa, etc.) y metabolitos antimicrobianos como bacteriocinas y lipopéptidos que favorecen la digestión y la inhibición de bacterias patógenas (Wang, 2007; Abarike *et al.*, 2018). Diversos estudios han determinado que la incorporación de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* o *B. velezensis* en alimento de *Penaeus vannamei* mejora significativamente el crecimiento, conversión alimenticia y la supervivencia (Campa-Córdova *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2025). Dentro del género, *Bacillus safensis* destaca por sus notables características genómicas y bioquímicas, que la posicionan como una especie con alto potencial biotecnológico. Esta bacteria se distingue por su resistencia a condiciones extremas, su capacidad para formar biopelículas (biofilm) y su producción de metabolitos con actividad antimicrobiana (Satomi *et al.*, 2006; Kothari *et al.*, 2013). Además, se han identificado cepas de *Bacillus safensis* con capacidad para sintetizar enzimas hidrolíticas (amilasas, lipasas y proteasas), presentar actividad antagónica frente a diversos

patógenos y tolerar amplios rangos de salinidad y pH (Berrada *et al.*, 2012; Kothari *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Weisskopf, 2013; Kumar *et al.*, 2014;).

Por otro lado, los ensayos *in vivo* son fundamentales para validar las propiedades genómicas y bioquímicas observadas *in vitro*. En cultivos de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), se ha demostrado que la administración de especies de *Bacillus* en el agua o el alimento puede mejorar significativamente la productividad, disminuir las concentraciones de amonio y nitrito, y fortalecer la respuesta inmunológica de los organismos (Kuebutornye *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2021b). No obstante, los efectos benéficos reportados pueden variar según la cepa específica y no solo de la especie bacteriana, ya que cada cepa nueva puede ofrecer características únicas, por lo que es muy importante la constante búsqueda de nuevas cepas de *Bacillus safensis* para su uso como probióticos en camarones, aunado a la cepa, estos beneficios dependen también del método de aplicación, la dosis y las condiciones de cultivo.

Por otro lado, en el cultivo de camarón, el alimento balanceado representa uno de los principales costos de producción, pudiendo alcanzar hasta el 60 % del costo total, lo que ha impulsado la búsqueda de ingredientes alternativos más sostenibles y económicamente viables (Molina, 2009). Tradicionalmente, harinas vegetales como trigo y otras materias primas de origen terrestre se utilizan como fuentes de energía digestible y aglutinantes; sin embargo, la creciente dependencia de estos cultivos incrementa la presión sobre el uso de suelo agrícola y recursos hídricos, además de contribuir a la huella ambiental de la acuicultura (Nieto-López *et al.*, 2011; Froehlich *et al.*, 2018; Nunes *et al.*, 2022). En este contexto, las macroalgas marinas han surgido como una alternativa prometedora para la formulación de dietas acuícolas, debido a su valor nutricional y funcional, así como a la presencia de compuestos bioactivos que pueden mejorar la digestibilidad y el crecimiento en camarón (Duarte *et al.*, 2022; García-Poza *et al.*, 2022; Matos *et al.*, 2024; Hernández-Sain *et al.*, 2025). Estos antecedentes destacan el potencial de las macroalgas como sustitutos parciales de ingredientes vegetales convencionales en la formulación de dietas para camarón.

En este contexto, la evaluación del efecto de las cepas identificadas de *Bacillus safensis* bajo diferentes formas de aplicación en agua, en alimento y en alimento pre-digerido constituye un enfoque innovador y necesario para determinar su eficacia y potencial uso en sistemas de cultivo de camarón.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de la acuicultura y el camarón blanco

La acuicultura se ha consolidado como uno de los sectores productivos de mayor crecimiento a nivel mundial ya que ofrece una alternativa sostenible frente a la sobreexplotación de los recursos pesqueros naturales. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2024), más del 50 % de los productos acuáticos destinados al consumo humano provienen actualmente de sistemas de cultivo. Este incremento responde a la creciente demanda de alimentos de alta calidad nutricional, al aumento de la población mundial y a la necesidad de garantizar la seguridad alimentaria global.

Dentro de las especies cultivadas, el camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*, sinónimo: *Litopenaeus vannamei*) ocupa un lugar importante debido a su alta tasa de crecimiento, capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales y excelente aceptación en los mercados internacionales. De acuerdo con la FAO (2024), esta especie representa más del 70 % de la producción mundial de camarón cultivado. En países latinoamericanos como México, Ecuador y Brasil, el cultivo de *Penaeus vannamei* constituye una actividad estratégica que contribuye significativamente al desarrollo económico regional y a la generación de empleo (Ponce-Palafox *et al.*, 2006), resultando fundamental implementar estrategias que reduzcan los costos asociados al alimento balanceado, el cual puede representar más del 50 % del costo total de producción (Ayisi *et al.*, 2017). Estas estrategias, junto con la búsqueda de alternativas sostenibles que mejoren la eficiencia alimenticia y la salud de los organismos, son esenciales para garantizar la competitividad y sostenibilidad del sector camaronícola.

El éxito productivo de *Penaeus vannamei* se ha visto impulsado por los avances tecnológicos en nutrición, genética y manejo sanitario. Sin embargo, la intensificación de los sistemas de cultivo y el aumento de la densidad de siembra han generado desafíos importantes, como el deterioro de la calidad del agua, la acumulación de materia orgánica y la proliferación de enfermedades infecciosas, lo que compromete la sostenibilidad y rentabilidad del sector (Emerenciano *et al.*, 2022). Uno de los principales problemas asociados a la intensificación de cultivos es el deterioro de la calidad del agua, provocado por la acumulación de restos de alimento no consumido,

materia orgánica y excretas de los organismos. Estos compuestos aumentan la carga de nitrógeno y fósforo en el sistema, lo que favorece procesos de eutrofización, disminución del oxígeno disuelto y proliferación de microorganismos patógenos oportunistas (Iber *et al.*, 2021; Emerenciano *et al.*, 2022). Además, la acumulación de sedimentos y metabolitos tóxicos como el amonio afecta directamente el bienestar y crecimiento del camarón, así como la microbiota benéfica del cultivo (Junior *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024).

Otro problema es la aparición de enfermedades infecciosas, especialmente de origen bacteriano y viral (Arulmoorthy *et al.*, 2020. El-Saadony *et al.*, 2022). Entre las más severas se encuentran el síndrome de la mancha blanca (WSSV), la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) y la septicemia bacteriana causada por *Vibrio* spp. (Valente *et al.*, 2020; Vandeputte *et al.*, 2024). Estos brotes generan pérdidas económicas significativas y reducen la productividad, lo que ha impulsado el uso desmedido de antibióticos y desinfectantes químicos en los sistemas de cultivo (Holmström *et al.*, 2003). El uso indiscriminado de antibióticos representa un riesgo tanto para la salud de los organismos cultivados como para el medio ambiente, ya que la exposición constante a estos compuestos ha contribuido a la aparición de cepas bacterianas resistentes, alteraciones en la microbiota intestinal del camarón y desequilibrios ecológicos en los estanques (Holmström *et al.*, 2003; Cabello *et al.*, 2016).

Por lo tanto, la búsqueda de alternativas biotecnológicas como los probióticos, prebióticos y simbióticos surgen como herramientas eficaces para mantener el equilibrio microbiano de los sistemas de cultivo, reducir el uso de antibióticos y fortalecer el sistema inmune de los organismos (Hai, 2015; Zorriehzaha *et al.*, 2016). Con base a lo anterior, el uso de microorganismos benéficos desempeña un papel fundamental en la prevención de enfermedades, la mejora de la calidad del agua y la optimización del crecimiento.

2.2 Uso de probióticos en la acuicultura

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedero al mejorar el equilibrio de su microbiota intestinal (FAO/WHO, 2001). En acuicultura, su aplicación se ha extendido no solo

a la alimentación de los organismos, sino también al manejo de la calidad del agua y de los sedimentos de los sistemas de producción (Merrifield *et al.*, 2010; Martínez-Córdova *et al.*, 2015). La acción de los probióticos en sistemas acuícolas se sustenta en diversos mecanismos, entre los cuales destacan la competencia por espacio y nutrientes frente a bacterias patógenas, la producción de compuestos antimicrobianos como bacteriocinas y ácidos orgánicos, la estimulación del sistema inmunológico, la mejora en la digestibilidad de los nutrientes y la degradación de la materia orgánica presente en el agua (Hai, 2015; Zorriehzahra *et al.*, 2016). Estos mecanismos, actuando de manera individual o combinada, contribuyen a modular favorablemente el ambiente microbiano y a fortalecer la respuesta fisiológica de los organismos cultivados.

En el cultivo de camarón blanco, numerosos estudios han demostrado que la administración de probióticos puede mejorar significativamente parámetros productivos como la tasa de crecimiento específico, la conversión alimenticia y la supervivencia, además de reducir la incidencia de enfermedades de origen bacteriano y viral (Amiin *et al.*, 2023; Abdelsamad *et al.*, 2024; Sha *et al.*, 2025). Asimismo, se ha visto que los probióticos contribuyen a mantener la estabilidad de la microbiota intestinal, lo que favorece la absorción de nutrientes y aumenta la resistencia frente a patógenos (Sha *et al.*, 2025).

En sistemas intensivos de cultivo de *Penaeus vannamei*, el uso de probióticos se ha consolidado como una herramienta esencial para mitigar los problemas derivados de la acumulación de materia orgánica, la disminución de la calidad del agua y la ocurrencia de brotes infecciosos. Se ha documentado que su aplicación, ya sea en el agua o incorporados al alimento, reduce la carga de *Vibrio* spp., mejora los procesos de nitrificación y favorece el equilibrio microbiano en los estanques (Martínez-Córdova *et al.*, 2015; Emerenciano *et al.*, 2022). También se ha visto que la incorporación de cepas pertenecientes a *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces* incrementa la supervivencia, promueve un crecimiento más eficiente y disminuye el uso de antibióticos en los sistemas de producción (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Zorriehzahra *et al.*, 2016).

Estos resultados adquieren especial relevancia en el contexto del cultivo intensivo de *Penaeus vannamei*, donde los desafíos sanitarios, la acumulación de nutrientes y el uso excesivo de antibióticos continúan siendo limitantes importantes para la sostenibilidad del sector. En consecuencia, la incorporación de probióticos en los sistemas de cultivo representa una estrategia clave para mejorar el rendimiento productivo, fortalecer la salud de los organismos y promover prácticas de producción más responsables y sostenibles.

2.3 *Bacillus* sp. en acuicultura

Los géneros de probióticos más empleados en acuicultura pertenecen a distintos grupos microbianos, entre ellos las bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*), las Actinobacteria y las levaduras del género *Saccharomyces* (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). Otro género de gran relevancia en sistemas acuícolas es *Bacillus*, reconocido por su capacidad de formar esporas altamente resistentes a cambios de temperatura, desecación, pH extremo y presión osmótica, facilita su incorporación en alimentos balanceados y su habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas (Cutting, 2011). Asimismo, diversas cepas de *Bacillus* exhiben propiedades probióticas de interés, como la secreción de enzimas extracelulares (amilasas, proteasas y lipasas), la modulación del sistema inmunológico y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana capaces de inhibir patógenos como *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus* (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

El género *Bacillus* comprende bacterias gram positivas formadoras de endosporas, ampliamente distribuidas en diversos ambientes, incluidos suelos, aguas y sedimentos marinos. Diversas cepas de *Bacillus* han sido identificadas como probióticos efectivos debido a sus múltiples mecanismos de acción que contribuyen a la salud y productividad de los organismos cultivados (Cheng *et al.*, 2023). Entre estos mecanismos se incluyen la competencia por nutrientes y nichos ecológicos con otros microorganismos, la producción de compuestos antimicrobianos que inhiben patógenos, la estimulación del sistema inmune, la mejora de la digestión y absorción de nutrientes y la contribución al mantenimiento de la calidad del agua (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Merrifield *et al.*, 2010).

En el cultivo de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), se ha documentado ampliamente el uso de probióticos del género *Bacillus*, particularmente *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*, los cuales han mostrado efectos positivos sobre el crecimiento, la eficiencia alimenticia y la respuesta inmune, especialmente en etapas tempranas del desarrollo (Monier *et al.*, 2023). Estudios realizados en postlarvas de *Litopenaeus vannamei* demostraron que la inclusión dietaria de estas especies mejora el desempeño productivo, incrementa la actividad de parámetros inmunológicos y favorece una mejor composición corporal, sin efectos adversos sobre la supervivencia (Sadat Hoseini Madani *et al.*, 2018). También se ha visto que el empleo de *Bacillus* para la fermentación del alimento o de ingredientes vegetales, puede mejorar el crecimiento, digestibilidad, eficiencia de utilización de alimento, supervivencia y respuesta inmune en camarones (Shiu *et al.*, 2015; De *et al.*, 2018).

Adicionalmente, se ha observado que estrategias para optimizar la viabilidad y liberación de los probióticos pueden potenciar sus efectos benéficos. En este contexto, Adilah *et al.* (2022) reportaron que la encapsulación de *Bacillus subtilis* en alginato con recubrimiento de quitosano mejoró significativamente el crecimiento, el estado de salud y la respuesta inmune de *Litopenaeus vannamei*, así como su resistencia frente a patógenos, en comparación con la administración del probiótico no encapsulado. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar no solo la cepa probiótica, sino también su forma de administración.

Por otra parte, el uso de probióticos multiespecie ha mostrado beneficios adicionales en la camaronicultura. Gruber *et al.* (2023) demostraron que la suplementación con un consorcio probiótico produjo mejoras significativas en el crecimiento y aumentó la resistencia de *Litopenaeus vannamei* frente a *Vibrio parahaemolyticus*, independientemente de la dieta utilizada, lo que sugiere un efecto directo sobre la microbiota intestinal y la respuesta inmune del hospedero.

Recientemente, distintos estudios se han enfocado particularmente en *Bacillus safensis* (Cutting, 2011; Hai, 2015), debido a su notable tolerancia a condiciones ambientales extremas, como la radiación, la desecación y la alta salinidad. Estas características reflejan su sobresaliente capacidad de resistencia y adaptación a entornos adversos en diversos sistemas acuícolas

(Chebotar *et al.*, 2023). A nivel genómico, *Bacillus safensis* comparte una alta identidad genética con *Bacillus pumilus*; no obstante, presenta diferencias en genes asociados con la síntesis de metabolitos secundarios, los sistemas de defensa y los mecanismos antioxidantes, lo que podría explicar su destacado potencial biotecnológico (Tirumalai *et al.*, 2018).

Asimismo, los genomas de cepas aisladas de ambientes marinos o industriales evidencian la presencia de genes que codifican lipopeptinas, surfactinas y fengicinas, compuestos con propiedades antimicrobianas y tensioactivas capaces de inhibir patógenos como *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp. (Kamilari *et al.*, 2025). De igual forma, *Bacillus safensis* ha sido reconocida como una bacteria con alto potencial probiótico debido a su capacidad para producir enzimas extracelulares como proteasas, lipasas, amilasas y quitinasas, las cuales favorecen la digestibilidad del alimento y mejoran la conversión alimenticia en organismos acuáticos (Wu *et al.*, 2021).

Además, *Bacillus safensis* presenta una elevada tolerancia a la salinidad (hasta 10%) y a un amplio rango de temperaturas (15–45 °C), lo que le permite sobrevivir en ambientes marinos y salobres característicos del cultivo de camarón (Satomi *et al.*, 2006; Azeem *et al.*, 2022). Otra característica relevante es su capacidad para formar biopelículas protectoras y establecer interacciones simbióticas en el intestino de peces y crustáceos, fortaleciendo la barrera intestinal y estimulando la respuesta inmune del hospedero (Wu *et al.*, 2021). Asimismo, se ha demostrado que *Bacillus safensis* puede reducir la carga bacteriana de patógenos como *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi*, contribuyendo a una mayor supervivencia y mejor crecimiento en camarones (*Penaeus vannamei*) (Huynh-Phuoc *et al.*, 2022).

Por otra parte, *Bacillus safensis* muestra potencial para la biorremediación de ambientes acuáticos, ya que es capaz de degradar compuestos orgánicos y nitrogenados, contribuyendo al mantenimiento de la calidad del agua en sistemas de cultivo intensivo (Kim *et al.*, 2021a).

En conjunto, estas propiedades posicionan a *Bacillus safensis* como una alternativa sostenible a los antibióticos y tratamientos químicos en la acuicultura moderna. No obstante, a pesar de su potencial biotecnológico, el conocimiento sobre los mecanismos genómicos y metabólicos que sustentan sus funciones probióticas en ambientes acuáticos aún es limitado.

De esta manera, la caracterización integral de los morfotipos de *Bacillus safensis* BS1-A y BS1-B permitirá comprender sus mecanismos de acción, su relación genómica con otras especies probióticas y su efecto *in vivo* sobre parámetros productivos en *Penaeus vannamei*, contribuyendo tanto al conocimiento científico como al desarrollo de alternativas prácticas para la camaronicultura.

2.4 Uso de macroalgas en alimento para camarón

El alimento balanceado representa uno de los principales costos de producción en la acuicultura de camarón, pudiendo superar el 50 % del costo total del cultivo, lo que ha impulsado la búsqueda de ingredientes alternativos más sostenibles y económicamente viables (Ayisi *et al.*, 2017). Tradicionalmente, harinas vegetales como trigo, sorgo y otras materias primas de origen terrestre se emplean en la formulación de dietas para camarón como fuentes de energía digestible y agentes aglutinantes; sin embargo, la creciente dependencia de estos cultivos incrementa la presión sobre el uso de suelo agrícola y recursos hídricos, además de contribuir a la huella ambiental de la acuicultura (Froehlich *et al.*, 2018; Duarte *et al.*, 2022).

En este contexto, las macroalgas marinas han surgido como una alternativa prometedora para la formulación de alimentos acuícolas, debido a que su cultivo no requiere agua dulce, tierras agrícolas ni fertilizantes externos, y además contribuye a la biorremediación de nutrientes y captura de carbono en ecosistemas costeros (García-Poza *et al.*, 2022; Matos *et al.*, 2024). Desde el punto de vista nutricional, las macroalgas contienen polisacáridos estructurales, minerales esenciales, compuestos fenólicos, pigmentos y fracciones proteicas con potencial funcional, lo que favorece su utilización como ingredientes innovadores en dietas para organismos acuáticos (Hernández-Sain *et al.*, 2025).

Diversos estudios han demostrado que la inclusión de macroalgas en dietas para camarón puede mejorar el crecimiento y la digestibilidad. Por ejemplo, la incorporación de *Ulva sp.* al 3 % en el alimento promovió el crecimiento y mejoró la pigmentación en juveniles de *Penaeus vannamei* (Cruz-Suárez *et al.*, 2009; Elizondo-González *et al.*, 2018). De manera similar, la inclusión de *Sargassum sp.* al 2.5 % incrementó la actividad de enzimas digestivas y el desempeño productivo

en camarón (Melchor-Martínez *et al.*, 2023). Asimismo, harinas de kelp como *Macrocystis* han sido evaluadas en dietas para camarón sin efectos negativos sobre el crecimiento cuando se incorporan a niveles menores al 10 % (Cruz-Suárez *et al.*, 2008; Cárdenas *et al.*, 2015).

Además, se ha reportado que la suplementación con macroalgas puede mejorar la composición corporal y la fisiología digestiva del camarón. La inclusión de extracto de *Macrocystis pyrifera* al 4 % incrementó el contenido proteico muscular y redujo los lípidos (Gutiérrez-Leyva *et al.*, 2015), mientras que la incorporación de *Ulva clathrata* al 3.4 % aumentó el contenido de fosfolípidos y ácidos grasos esenciales en organismos reproductores de *Penaeus vannamei* (Corral-Rosales *et al.*, 2019). Estos efectos han sido asociados a la presencia de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antibacterianas y moduladoras de la respuesta fisiológica del hospedero (Múzquiz de la Garza *et al.*, 2019; Pourmozaffar *et al.*, 2025).

Aunque la inclusión de macroalgas en alimentos acuícolas ha mostrado beneficios en diversas especies, su uso suele estar limitado por el alto contenido de fibra insoluble, lo que reduce la digestibilidad. En este sentido, los procesos de valorización que transforman o reducen esta fracción representan una estrategia prometedora para mejorar su aprovechamiento y el rendimiento en sistemas acuícolas (Peña-Rodríguez *et al.*, 2022). Se destaca dentro de estos procesos, la fermentación y predigestión para la obtención de compuestos de alto valor nutricional (Peña-Rodríguez *et al.*, 2022). Los microorganismos empleados para la fermentación/predigestión aprovechan los polisacáridos de las macroalgas como sustrato para su crecimiento, y mejora la biodisponibilidad de compuestos bioactivos y promueve su biotransformación, incrementando el valor nutricional de la biomasa algal (Reboleira *et al.*, 2021). Estos procesos de valorización en las macroalgas pueden incrementar el nivel de proteína y lípidos y reducir los niveles de fibra cruda mejorando su digestibilidad (Felix y Brindo, 2014; Hardjani *et al.*, 2017).

En conjunto, estos antecedentes evidencian que las macroalgas marinas representan una alternativa viable para la sustitución parcial de ingredientes vegetales convencionales en la formulación de dietas para camarón, con el potencial de mejorar la eficiencia digestiva, el crecimiento y la sostenibilidad de los sistemas de cultivo.

3. JUSTIFICACIÓN

La creciente demanda mundial de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) ha impulsado el desarrollo de estrategias biotecnológicas sostenibles que permitan optimizar la productividad y reducir el impacto ambiental de la acuicultura intensiva. En este contexto, el uso de probióticos bacterianos del género *Bacillus* ha cobrado especial relevancia debido a su capacidad para mejorar la salud intestinal, estimular el sistema inmunológico y favorecer la calidad del agua mediante la degradación de compuestos orgánicos. Sin embargo, la investigación de nuevas especies y cepas bacterianas permite identificar aquellas con funciones superiores o adicionales, ya que la eficacia de estos microorganismos depende en gran medida de su origen, características fisiológicas y potencial funcional, aspectos que pueden ser comprendidos a profundidad mediante el análisis genómico. Por ello, el estudio genómico, la caracterización de dos morfotipos de *B safensis* (BS1-A y BS1-B) y su evaluación *in vivo* en el cultivo de camarón, representan un paso fundamental para evaluar su potencial biotecnológico como probióticos para su aplicación en la acuicultura de *Penaeus vannamei*.

4. HIPÓTESIS

Los morfotipos de *Bacillus safensis* BS1-A y BS1-B, debido a sus características genómicas, bioquímicas y antagonistas frente a patógenos, mejoran el rendimiento productivo de *Penaeus vannamei* cuando se aplican en el sistema de cultivo, en comparación con organismos cultivados sin estas bacterias.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el potencial probiótico de *Bacillus safensis* en el cultivo de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), a través de su caracterización genómica, bioquímica y funcional, así como su efecto *in vivo* sobre parámetros productivos y de conversión alimenticia.

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar dos morfotipos de *Bacillus safensis* a nivel bioquímico, fisiológico y genómico, determinando su capacidad enzimática, de tolerancia ambiental y de antagonismo frente a bacterias patógenas del género *Vibrio*.
2. Evaluar *in vivo* el efecto de la aplicación de *Bacillus safensis* (en agua, en alimento y en alimento pre-digerido) en términos de rendimiento productivo del camarón *Penaeus vannamei*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Caracterización de *Bacillus safensis*

6.1.1 Aislamiento, conservación e identificación

La cepa de *Bacillus safensis* empleada en el presente estudio fue aislada de una esponja marina por Galicia-Nicolás *et al.*, (2018) y presentó inicialmente dos morfotipos coloniales bien diferenciados: uno de mayor tamaño (BS1-A) y otro de menor tamaño (BS1-B). Una vez obtenidos los cultivos de ambos morfotipos, estos fueron conservados de la siguiente manera: las cepas se cultivaron en medio líquido caldo soya tripticaseína suplementado con 2.5 % de NaCl (TSB+) a 35 °C durante 24 h con agitación constante a 100 rpm. Posteriormente, se prepararon criotubos que contenían 500 µL de glicerol puro y 500 µL de cada suspensión celular. Finalmente, los cultivos se conservaron a -80 °C como stock y a -20 °C como alícuotas de trabajo. Ambos morfotipos se evaluaron bajo condiciones experimentales idénticas, aplicándose los mismos procedimientos en todos los ensayos.

6.1.2 Pruebas bioquímicas

La caracterización bioquímica de las cepas de *Bacillus safensis* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Díaz *et al.*, (1995) y Mac Faddin (2003) y con modificaciones: movilidad, indol, ornitina, Citrato de Simmons, catalasa, oxidasa, rojo de metilo, fermentación de hidratos de carbono (glucosa, lactosa, manitol, sorbitol, arabinosa, trehalosa, xilosa, galactosa y maltosa), rango de temperatura (4, 15, 25, 30, 35 y 45°C), rango de cloruro de sodio (0, 3, 6, 8, 10 y 13%), utilizando las cepas *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Staphylococcus aureus* como control positivo y negativo según fuera el caso de la prueba a realizar.

De forma resumida se enlistan las siguientes metodologías:

- a) **Tinción de Gram:** Se realizó tinción de Gram (Gram, 1884) de las cepas de *Bacillus safensis* con la finalidad de verificar que son de tipo Gram +, así como la forma celular mediante la observación con microscopio, para esta prueba se utilizó un Kit comercial para Tinción de Gram.

- b) **Movilidad, Indol y Ornitina (MIO):** El medio MIO es un medio semisólido empleado para la diferenciación de enterobacterias mediante la evaluación de tres características fisiológicas: motilidad, actividad de la ornitina descarboxilasa y producción de indol. La motilidad bacteriana se evidencia por la turbidez del medio o por el crecimiento que se dispersa lateralmente desde la línea de inoculación. La descarboxilación de la ornitina se interpreta a partir del cambio de color del medio: un tono púrpura indica una reacción positiva, mientras que un color amarillo en el fondo del tubo corresponde a una reacción negativa. Para la detección de indol, es indispensable registrar previamente las reacciones de motilidad y descarboxilación de ornitina antes de añadir el reactivo de Kovac. Posteriormente, se agregaron 3–4 gotas del reactivo y se agitó suavemente el tubo. La aparición de una capa superior roja o rosada indica un resultado positivo, debido a que el reactivo de Kovac detecta microorganismos capaces de degradar el triptófano y liberar indol, el cual reacciona con el p-dimetilaminobenzaldehído para producir un compuesto de color rojo oscuro (Ederer y Clark, 1970). Para esta prueba, se inoculó un cultivo microbiano de 24 h con asa recta en el medio MIO durante 24 h y posteriormente se realizaron las observaciones antes mencionadas.
- c) **Citrato de Simmons:** El agar Citrato de Simmons nos permite determinar la capacidad de un microorganismo de metabolizar el citrato como única fuente de carbono en ausencia de fermentación de azúcares o de producción de ácido láctico y el fosfato de amonio como única fuente de fosfato. Para esta prueba, se inoculó un cultivo microbiano de 24 h con asa recta en el medio Citrato de Simmons durante 24 h. El indicador de pH es el azul de bromotimol, el cual en presencia de alcalinidad vira al color azul indicando que la prueba es positiva. Cuando no hay cambio de color ni crecimiento se dice que la prueba es negativa (Koneman, 1997; Mac Faddin, 2003).
- d) **Catalasa:** La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. La actividad catalasa se determinó añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno sobre una asada del cultivo microbiano de 24 h de crecimiento en un portaobjetos. La producción de burbujas indica la presencia de la enzima (Mac Faddin, 2003)

- e) **Oxidasa:** Esta prueba nos ayuda a determinar la presencia de enzimas oxidasas, pues el reactivo utilizado activa la oxidación del citocromo para reducirlo por oxígeno molecular y producir agua o peróxido de hidrógeno, según la especie bacteriana. Además, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica. Para realizar esta prueba es necesario utilizar sensibilizadores impregnados con parafenilendiamina en donde se coloca una asada del cultivo microbiano utilizando un asa especial de platino. Si las células contienen citocromo c oxidasa, el reactivo se vuelve de color violeta o púrpura, si no es así, el disco se queda incoloro (Mac Faddin, 2003).
- f) **Rojo de metilo:** La prueba Rojo de Metilo, nos permite conocer la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos ácidos de la fermentación de la glucosa, es una prueba cualitativa de la producción de ácido que ayuda a la determinación del pH. Se inoculó un cultivo microbiano de 24 h con un asa en caldo rojo de metilo a 35°C durante 48 h mínimo ya que, si la prueba se realiza en menos de 48 h, todos los microorganismos podrían dar un falso positivo, sin embargo, luego la incubación correcta (2 a 5 días), los microorganismos rojo de metilo positivos son capaces de mantener la producción de ácidos que disminuye el pH terminal, manteniendo un ambiente ácido. Posteriormente a la incubación es necesario agregar 5 gotas de indicador de pH rojo de metilo que permite revelar la prueba, el resultado es positivo si el medio se mantiene rojo brillante (pH 4.4 - 4.2), amarillo negativo (pH 6.0), naranja indica una reacción tardía y es necesario repetir la prueba (Mac Faddin, 2003).
- g) **Fermentación de hidratos de carbono:** Esta prueba permite determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio basal, con producción de ácido o ácido con gas. Generalmente se emplea una batería de 8–10 azúcares; en este estudio se utilizaron nueve fuentes de carbono: glucosa, lactosa, manitol, sorbitol, arabinosa, trehalosa, xilosa, galactosa y maltosa. Se inoculó, con ayuda de un asa bacteriológica, un cultivo de 24 h en el caldo base suplementado con cada uno de los azúcares y posteriormente se incubó a 35 °C durante 24 h. La interpretación se realizó con base en el cambio de color del indicador: amarillo para resultados positivos, rosa rojizo para

negativos y naranja para reacciones tardías. Los tubos que presentaron coloración naranja fueron reincubados por 24–48 h adicionales y reevaluados antes de reportarse como negativos definitivos, de acuerdo con lo descrito por Mac Faddin (2003).

- h) **Determinación del rango de tolerancia a la temperatura:** La tolerancia a la temperatura de las cepas bacterianas se evaluó mediante su siembra en placas de agar tripticaseína soya (TSA) suplementado con 2.5% (p/v) de NaCl. La inoculación se realizó utilizando el método de estría cruzada. Posteriormente, las placas fueron incubadas durante 24 h a diferentes temperaturas: 4, 15, 25, 30, 35 y 45 °C. El crecimiento bacteriano se evaluó a las 24 y 48 h de incubación. Se consideró como crecimiento positivo la presencia de colonias visibles a las 24 o 48 h, mientras que la ausencia de crecimiento durante este periodo se clasificó como resultado negativo.
- i) **Determinación del rango de tolerancia a la salinidad (NaCl):** Para evaluar la tolerancia a la salinidad de las cepas bacterianas, estas se sembraron en placas de agar tripticaseína soya (TSA) suplementado con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl): 0, 3, 6, 8, 10 y 13% (p/v). La siembra se realizó mediante el método de estría cruzada, asegurando una distribución homogénea del inóculo sobre la superficie del medio de cultivo. Las placas se incubaron a 35 °C y fueron evaluadas a las 24 y 48 h de incubación. Se consideró crecimiento positivo cuando se observó desarrollo visible de colonias bacterianas a las 24 o 48 h, mientras que se clasificaron como negativas aquellas cepas que no presentaron crecimiento durante el periodo de evaluación.

6.1.3 Determinación cualitativa de actividad de enzimas digestivas

Se realizaron los siguientes análisis de actividad enzimática digestiva:

- a) **Hidrólisis de gelatina (producción de proteasas):** Para determinar la capacidad de hidrólisis de gelatina de las cepas, se aplicó la metodología de Prescott *et al* (2004). Se utilizó el medio agar bacteriológico con gelatina al 0.4% adicionado con 2.5% de NaCl. Las cepas se inocularon por punción en el medio de cultivo y se incubaron a 35° C durante 48 h. El revelado de la prueba se realizó con cloruro mercúrico ácido, para esto, se cubre la placa con el reactivo precipitante. El precipitado blanco indica presencia de gelatina no hidrolizada, mientras que la ausencia de este en la región de crecimiento bacteriano indica un resultado positivo.

- b) **Hidrólisis de almidón (producción de amilasas):** La determinación de hidrólisis de almidón se realizó siguiendo la metodología descrita por Achi y Nijoku (1992). Se utilizó agar bacteriológico adicionado con 0.2% almidón (g/l): K₂HPO₄ 4, 3; MgSO₄·7H₂O, 1; triptona, 1; CaCl₂·2H₂O, 0.3; extracto de levadura, 2; citrato de sodio, 0.5; harina de soya. La inoculación de las cepas se realizó por punción y posteriormente se incubó a 35°C durante 24 h. Para el revelado de la prueba se emplearon 1.5 mL de lugol, y el resultado se considera positivo al observar un halo transparente alrededor de la punción bacteriana.
- c) **Hidrólisis de celulosa (producción de celulasas):** La capacidad de producción de enzimas celulasas se determinó mediante el método descrito por Viteri *et al.*, (2015), utilizando un medio modificado con carboximetilcelulosa (CMC), como única fuente de carbono (CMC, 10; NaNO₃, 0.5; K₂HPO₄, 1.0; MgSO₄·7H₂O, 0.5; KCl, 0.5; FeSO₄·7H₂O 0.001 g/l) (Waghmare *et al.* 2014). Las cajas se incubaron por punción a 30°C durante 72 h posteriormente se cubrió con una solución de Rojo Congo, al 0.05%, durante 10 minutos, se retiró el Rojo Congo y se cubrió con solución salina 1M, durante una hora. Al término de la hora, se eliminó la solución salina y se cubrió con ácido acético al 2%, por diez segundos; finalmente, se descartó el ácido acético. El resultado se considera positivo al observar un halo claro de hidrólisis de celulosa.

6.1.4 Preparación del inóculo y determinación de la curva de crecimiento

Se obtuvo una colonia bacteriana a partir de una placa de TSA+ incubada durante 24 horas y posteriormente inoculada en un matraz que contenía 20 mL de TSB suplementado con 2.5% de NaCl (TSB+). El cultivo se incubó a 30 °C, con agitación a 100 rpm durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, la suspensión se ajustó a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm y se utilizó como inóculo fresco para añadir 200 µL de TSB+ en cada pozo de una microplaca, en una proporción 1:10. La microplaca fue incubada a 30 °C en un lector de microplacas, programado para registrar la densidad óptica cada hora a una longitud de onda de 600 nm, durante un periodo de 48 horas (MultiskanGo, Thermo Scientific). Para cada curva de crecimiento bacteriano se realizaron tres réplicas biológicas independientes.

Las curvas de crecimiento de ambas cepas de *Bacillus safensis* se obtuvieron representando el número de células en función del tiempo, y la tasa específica de crecimiento se determinó

mediante un modelo empírico (ecuación 1). La concentración bacteriana se estimó como células por mililitro a partir de unidades formadoras de colonias, obtenidas por siembra de diluciones seriadas en TSA+.

$$\mu = \text{Ln} (N/\text{No}) / \Delta T \quad (1)$$

Donde:

N = número final de células

No = número inicial de células

ΔT = intervalo de tiempo transcurrido entre No y N

6.1.5 Ensayo de actividad antagonica mediante la técnica punto-punto (dot-spot)

Las bacterias patógenas del género *Vibrio* (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio diabollicus* y *Vibrio harveyi*) se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Biotecnología de Bacteriófagos y Microalgas del CIBNOR. Previo a los ensayos, todos los aislados se cultivaron individualmente en agar tripticasa-soya suplementado con 2.5% de NaCl (TSA+) e incubaron durante 24 h a 30 °C. Las suspensiones bacterianas se ajustaron a una concentración aproximada de 10^7 UFC mL⁻¹, con base en la absorbancia a 600 nm (OD₆₀₀), y se distribuyeron uniformemente sobre placas de TSA+. Posteriormente, la solución concentrada de cada aislado se sembró en la superficie de las placas. Los morfotipos de *Bacillus safensis* (BS1-A y BS1-B) se evaluaron por triplicado, aplicando tres puntos de 5 μ L de suspensión bacteriana por repetición. Como controles positivos, se colocaron en el extremo opuesto de las placas tres discos de papel filtro impregnados con 30 μ g de cloranfenicol cada uno. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h. Los puntos que desarrollaron halos de inhibición alrededor se consideraron positivos para actividad antagonista, registrándose el diámetro de cada halo (Kewcharoen y Srisapoome, 2019). Para confirmar la actividad observada, el ensayo se repitió en aquellas cepas que mostraron halos al menos en una de las especies de *Vibrio* evaluadas.

6.2 Análisis genómico

6.2.1 Secuenciación del genoma completo de las cepas BS1-A y BS1-B

El ADN genómico de los morfotipos BS1-A y BS1-B fue extraído utilizando el kit QIAamp DNA Microbiome, siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), mientras que su concentración se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). El ADN extraído fue fragmentado con el kit Illumina Nextera XT, posteriormente indexado y secuenciado en la plataforma Oxford nanopore con el fin de obtener secuencias largas, suficiente para la identificación de los aislados.

6.2.2 Análisis bioinformático

La secuenciación completa de los morfotipos BS1-A y BS1-B fue realizada por la empresa Plasmidsaurus mediante tecnología de lectura larga Oxford Nanopore, empleando protocolos de secuenciación y ensamblaje con análisis bioinformáticos personalizados. Los genomas ensamblados fueron sometidos a una primera etapa de anotación automática y revisión manual utilizando Prokka v1.14.6 (Seemann, 2014), con el objetivo de identificar genes codificantes, ARNr, ARNt y otros elementos genómicos relevantes. Posteriormente, las anotaciones fueron refinadas mediante el NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP), lo que permitió una caracterización funcional más completa y estandarizada. La identidad nucleotídica promedio (ANI) entre los genomas fue calculada utilizando FastANI v1.1.0 (Jain *et al.*, 2018), como criterio para evaluar la cercanía filogenética y confirmar su afiliación taxonómica. Para la identificación de regiones genómicas de posible origen exógeno, se empleó Alien Hunter v1.1.0 (Vernikos y Parkhill, 2006), con el fin de detectar eventos potenciales de transferencia horizontal de genes. Asimismo, la detección de secuencias relacionadas con bacteriófagos se realizó utilizando Phastest 3.0 v1.0.1 (Wishart *et al.*, 2023) y VirSorter2 (Guo *et al.*, 2021).

La búsqueda de genes asociados a resistencia antimicrobiana se llevó a cabo mediante ResFinder v4.7.2 (Clausen *et al.*, 2018; Bortolaia *et al.*, 2020;), AMRFinderPlus v4.0.23 (Feldgarden *et al.*, 2021) y el Resistance Gene Identifier (RGI) v6.0.0, empleando como referencia la Comprehensive

Antibiotic Resistance Database (CARD) (Alcock *et al.*, 2022). De forma complementaria, los factores de virulencia fueron identificados utilizando Vfanalyzer, con base en la Virulence Factor Database (VFDB) (Liu *et al.*, 2018). Para la identificación de clústeres génicos involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, se utilizaron antiSMASH v7.0 (Blin *et al.*, 2023), PRISM4 (Skinnider *et al.*, 2020) y BAGEL4 (van Heel *et al.*, 2018). La visualización circular de los genomas se generó mediante el servidor PROKSEE (Grant *et al.*, 2023), permitiendo una representación integral de la organización genómica.

El análisis de pangenoma de los morfotipos BS1-A y BS1-B se llevó a cabo en conjunto con genomas estrechamente relacionados disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI; National Center for Biotechnology Information). Para este propósito, se descargaron 36 genomas completos de cepas de *Bacillus safensis*. Los archivos en formato FASTA fueron anotados de manera uniforme con Prokka, y posteriormente se realizó el análisis comparativo del pangenoma utilizando Roary v3.13.0 (Page *et al.*, 2015). La alineación de los genes del núcleo obtenida a partir de Roary fue depurada con trimAl v1.5.rev1 (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009) para eliminar regiones mal alineadas o con alta variabilidad. Finalmente, se construyó un árbol filogenético por máxima verosimilitud utilizando RaxML v8.2.12 (Stamatakis, 2014), con 100 réplicas de bootstrap para evaluar la robustez de las ramas. La matriz de presencia/ausencia génica generada por Roary y el árbol filogenético obtenido con RaxML se integraron en Phandango (Hadfield *et al.*, 2017) para la visualización conjunta del pangenoma en forma de mapa de calor.

6.2.3 Efecto de las cepas en la supervivencia de *Artemia franciscana*

Como ensayo preliminar se evaluó el efecto de los morfotipos BSA-1 y BSA1-B sobre la supervivencia de *Artemia franciscana*. Se utilizaron quistes comerciales (marca INVE). Los quistes fueron hidratados en agua destilada estéril durante 60 min y posteriormente desencapsulados mediante su exposición a una solución de hipoclorito de sodio al 50% (60 g/L de cloro activo) durante 35 s. Finalizado este proceso, los quistes fueron enjuagados abundantemente con agua destilada estéril para eliminar residuos del agente desencapsulante. Los quistes flotantes,

considerados no viables por ausencia de eclosión, fueron descartados conforme a lo descrito por Sorgeloos *et al.* (1998).

Posteriormente, por triplicado se colocaron 30 quistes en cada tubo que contenía 10 mL de solución salina estéril (NaCl al 2.5%). A cada tratamiento se le añadieron, por separado, diferentes concentraciones (1, 10, 100 y 1000 μL) de cada uno de los morfotipos, previamente ajustados a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm (DO_{600}) equivalente a 2.6×10^7 UFC/ mL^{-1} .

Los tubos se incubaron a 30 °C durante 24 h bajo condiciones de agitación constante. Al término del periodo de incubación, se realizó el conteo de los organismos eclosionados y se determinó la supervivencia de *Artemia salina* en cada tratamiento.

6.3 Evaluación *in vivo* del efecto de la aplicación de *Bacillus safensis* (en agua de cultivo, alimento y alimento pre-digerido)

6.3.1 Evaluación *in vivo* de BS1-A y BS1-B en el agua de cultivo de camarón.

6.3.2 Elaboración de alícuotas de BS1-A y BS1-B

Para la elaboración de las alícuotas utilizadas en el bioensayo, se sembraron 100 μL de las alícuotas de trabajo preservadas en glicerol puro a -20°C en matraces con 20 mL de TSB 2.5% NaCl y se incubaron en agitación a 30° C durante 24 h. Pasadas las 24 h, las cepas se centrifugaron en tubos falcón de 50 mL a 3,600 x g durante 15 min y se decantó el sobrenadante. Posteriormente, los pellets obtenidos se resuspendieron en 20 mL de solución salina al 2.5%, se agitaron en un vortex y se determinó la densidad óptica (600 nm) de cada cepa para calcular los microlitros necesarios para obtener una concentración final de 2.50×10^7 UFC L^{-1} en los tanques de cultivo experimentales utilizando las fórmulas obtenidas al momento de realizar las curvas de crecimiento de cada cepa.

6.3.3 Bioensayo de aplicación de BS1-A y BS1-B en el agua de cultivo

Para la evaluación del efecto de los morfotipos BS1-A y BS1-B como potencial probiótico en camarón blanco, se realizó un bioensayo con juveniles de *Penaeus vannamei* con un peso

promedio inicial de 0.5 ± 0.01 g durante 6 semanas en el laboratorio húmedo de nutrición acuícola del CIBNOR.

Se evaluaron tres tratamientos, un tratamiento Control al cual solo se le agregó melaza 1 mg L^{-1} , el tratamiento BACT (melaza 1 mg L^{-1} + *Bacillus safensis* concentración final de 2.50×10^7 UFC L^{-1}) y el tratamiento PROB (melaza 1 mg L^{-1} + Probiótico comercial concentración final de 2.50×10^7 UFC L^{-1}). Para la cuarta y quinta semana de experimentación el porcentaje de melaza se incrementó a 1.5 y 2 mg L^{-1} respectivamente debido al incremento de biomasa de camarón, así como de alimento, con la finalidad de controlar el amonio en el agua de cultivo.

Cada tratamiento consistió en cuatro réplicas conteniendo 11 camarones cada una. Los animales se colocaron en acuarios de 50 L con agua de mar, temperatura controlada de $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$, aireación continua (D.O. $> 5.0 \text{ mg L}^{-1}$), recambio del 10% de agua diariamente y biometrías cada semana. Durante todo el periodo experimental, se tomaron semanalmente muestras de agua de los tanques para el análisis de la calidad del agua en términos de nitrógeno amoniacal total (TAN), nitritos, nitratos, fosfato y pH (API Marine, saltwater master test kit, FL, USA), y cada cuatro días se cuantificaron por triplicado las partículas de sólidos sedimentables totales (TSS) en mL L^{-1} utilizando conos Imhoff de 1 L. Al finalizar el periodo experimental se evaluaron los siguientes parámetros zootécnicos:

- **Ganancia en peso (GP):** ganancia en gramos por camarón (Kureshy y Davis, 2002)

$$GP = pf - pi \quad (2)$$

Dónde: pf = peso final del organismo y pi = peso inicial del organismo

- **Tasa de crecimiento específico (TCE % día):** crecimiento promedio del organismo al día (Fóes *et al.*, 2016)

$$TCE (\%) \text{ día} = \frac{100 \times (\ln pf - \ln pi)}{t} \quad (3)$$

Dónde: pf = peso final del organismo, pi = peso inicial del organismo y t = duración en días

- **Tasa de crecimiento (TC%):** Crecimiento ponderal promedio expresado en porcentaje (Flores-Leyva, 2006)

$$TC\% = 100x(pf - pi)/pi \quad (4)$$

Dónde: pf = el peso final del camarón y pi = peso inicial del organismo

- **Alimento consumido:** Expresado en g/camarón/día (Flores-Leyva, 2006)

$$AC = \text{Alimento total consumido} / (N_i + N_f + 2 \times \text{tiempo (días)}) \quad (5)$$

Dónde: N_i representa el número de organismos iniciales y N_f es el número final de organismos.

- **Supervivencia (S):** Porcentaje de organismos vivos durante el tiempo de experimentación (Flores-Leyva, 2006)

$$S = \frac{N_f}{N_i} \times 100 \quad (6)$$

Dónde N_f = Número final de organismos y N_i = Número inicial de organismos

- **Factor de conversión alimenticia (FCA):** Cantidad de gramos de alimento necesaria para aumentar una unidad de peso (Fóes *et al.*, 2016)

$$FCA = \text{alimento consumido} / \text{total de biomasa producida} \quad (7)$$

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% para evaluar diferencias significativas entre tratamientos. En caso, de observarse diferencias significativas, se realizó una prueba de Tukey para identificar las diferencias entre los grupos experimentales.

6.4 Evaluación de los morfotipos BS1-A y BS1-B adicionado en el alimento y su efecto en el cultivo de camarón

6.4.1 Formulación y elaboración de alimentos

Se formularon y fabricaron seis diferentes alimentos balanceados para camarón considerando sus requerimientos nutricionales, y en el caso de *Bacillus safensis* la adición en partes iguales de BS1-A y BS1-B (Tabla 1): C1 (Alimento control), CB (Alimento control + *Bacillus safensis* 5×10^7 UFCg⁻¹), A1 (Mix de algas), AB (Mix de algas + *Bacillus safensis* 5×10^7 UFC g⁻¹) M1 (Mix de algas y harinas vegetales) y MB (Mix de algas y harinas vegetales + *Bacillus safensis* 5×10^7 UFC g⁻¹). La elaboración y análisis de los alimentos se desarrolló de la siguiente manera: todas las harinas se molieron en

pulverizador y se tamizaron a 450 μm . Los ingredientes secos se mezclaron hasta homogeneizar en una mezcladora de 1,5 L (Kitchen-Aid™, EE. UU.), posteriormente se adicionaron los ingredientes a base de aceite y finalmente agua (350 ml kg^{-1}) y se mezcló hasta tener una masa homogénea (~8 min). La mezcla se pasó por un molino de carne ($\frac{1}{2}$ hp Torrey®, MX) a través de un dado de 2 mm para la formación de pellets de ~1cm de largo. Finalmente, los pellets se secaron hasta un 10% de humedad a 45°C (10 h) en un horno de convección y se almacenaron a 4°C.

Cada dieta experimental previo a la incorporación de las bacterias, se analizó con la metodología AOAC (2005): humedad (930.15), proteína (Método Dumas, 990.03), lípidos (Soxtec Avanti, 920.39), fibra cruda (978.10), y ceniza (942.05). Se calculó también el extracto libre de nitrógeno (ELN) por diferencia: $100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ fibra cruda} + \% \text{ ceniza})$.

Para la incorporación de las bacterias al alimento, se sembraron 100 μL de los morfotipos BS1-A, BS1-B preservadas en glicerol puro a -20°C en matraces con 20 mL de TSB 2.5% NaCl y se incubaron en agitación a 30°C durante 24 h. Pasadas las 24 h, las cepas se centrifugaron en tubos Falcon de 50 mL a 3,600 x g durante 15 min para decantar el sobrenadante. Posteriormente, los pellets obtenidos se resuspendieron en 20 mL de solución salina al 2.5%, se agitaron en un vortex para determinar la densidad óptica (600 nm) de cada cepa y calcular los microlitros necesarios para obtener una concentración final de 5×10^7 UFC mL^{-1} de ambas cepas de acuerdo a las curvas de crecimiento de cada cepa y agregarla a los pellets de cada dieta por medio de aspersión mientras se agitaban gentilmente, las bacterias se agregaron al alimento diariamente antes de alimentar.

Tabla 1. Formulación (g kg⁻¹ dieta) y composición proximal (% base seca)

Ingrediente	C1	CB	A1	AB	M1	MB
Harina de pescado ^a	130	130	130	130	130	130
Harina de ave ^b	220	220	220	220	220	220
Harina de soya ^b	300	300	300	300	300	300
Harina de trigo ^c	234	234	--	--	117	117
<i>Egregia sp.</i>	--	--	71	71	35.5	35.5
<i>Macrocystis sp.</i>	--	--	71	71	35.5	35.5
<i>Sargassum sp.</i>	--	--	71	71	35.5	35.5
Sorgo	50	50	--	--	25	25
<i>U. lactuca</i>	--	--	71	71	35.5	35.5
<i>Bacillus safensis</i> (UFC g ⁻¹)		5x10 ⁷		5x10 ⁷		5x10 ⁷
Lecitina de soya ^d	25	25	25	25	25	25
Aceite de pescado ^a	25	25	25	25	25	25
Alginato de sodio ^e	10	10	10	10	10	10
Premezcla vitamínica y mineral ^f	4	4	4	4	4	4
Vitamina C ^g	1	1	1	1	1	1
Cloruro de colina ^e	1	1	1	1	1	1
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Composición proximal (% en materia seca)						
Proteína	40.1±0.02		40.3±0.04		40.0±0.01	
Lípidos	9.23±0.03		9.23±0.03		8.83±0.03	
Fibra cruda	0.77± 0.06		2.10±0.00		1.23±0.06	
Cenizas	10.3±0.03		20.7±0.05		16.5±0.05	
ELN	39.61		27.72		33.44	

^a PMA S.A. de C.V., Jalisco, MX.

^b PIASA S.A. de C.V., Baja California Sur, MX.

^c Molino San Cristóbal, Sonora, MX.

^d Cedrosa SA de CV, Estado de México, MX.

^e Sigma Aldrich, Missouri, US.

^f Premezcla vitamínica y mineral: Vit. A, 4000 IU g⁻¹; B1, 24 g kg⁻¹; B2, 16 g kg⁻¹; DL Ca pantotenate, 30 g kg⁻¹; B6, 30 g kg⁻¹; B12, 80 mg kg⁻¹; K3, 16 g kg⁻¹; D3, 3200 IU g⁻¹; E, 60 g kg⁻¹; H, 400 mg kg⁻¹; niacin 20 g kg⁻¹; folic acid, 4 g kg⁻¹; Co 2 g kg⁻¹; Mn, 16 g kg⁻¹; Zn, 40 g kg⁻¹; Cu 20 g kg⁻¹; Fe, 1 mg kg⁻¹; Se, 100 mg kg⁻¹; I 2 g kg⁻¹. Sigma-Aldrich, USA

^g Prilabsa, Sinaloa, MX

6.4.2 Bioensayo de crecimiento con camarón

Para la evaluación del rendimiento productivo de los alimentos formulados, se realizó un bioensayo de cuatro semanas de cultivo para evaluar los seis tratamientos en tanques de 50 L bajo condiciones controladas de laboratorio (37 ups, $28^{\circ}\text{C} \pm 0.6$, O.D. $> 5 \text{ mg L}^{-1}$). Cada tratamiento consistió en tres réplicas con 15 organismos (peso húmedo promedio inicial de $0.16 \pm 0.01 \text{ g}$) distribuidos aleatoriamente y aireación continua. Durante el experimento se monitoreó calidad de agua en términos de amonio, nitritos, nitratos, fosfato y pH (API Marine Saltwater Master Test Kit®, Fl, EE. UU.). Se alimentó a saciedad partiendo con el 10% de biomasa de camarón dividida en dos raciones (09:00 y 14:30 h), se realizaron recambios de agua cada dos días del 20% y biometrías cada dos semanas. Además, se evaluó el rendimiento productivo de los camarones en términos de crecimiento, supervivencia y eficiencia de utilización de alimento como lo referido en el punto 6.2.2.

6.5 Evaluación de *Bacillus safensis* (BS1-A y BS1-B) en la pre-digestión por fermentación de alimento y su efecto en el cultivo de camarón

6.5.1 Formulación y elaboración de alimentos

Se formularon y fabricaron diferentes alimentos balanceados con la misma formulación que el experimento de adición de bacterias en el alimento (Tabla 2), y en el caso de los tratamientos con bacterias la concentración fue en partes iguales de ambos morfotipos. Los tratamientos fueron: C (Alimento de referencia), Cb (Alimento de referencia digerido por *Bacillus safensis*), A (Mix de algas), Ab (Mix de algas digerido por *Bacillus safensis*) M (Mix de algas y harinas vegetales) y Mb (Mix de algas y harinas vegetales digerido por *Bacillus safensis*).

Los tratamientos Cb, Ab y Mb fueron adicionados con ambas cepas de *Bacillus safensis* a una concentración final de $6 \times 10^7 \text{ UFCg}^{-1}$, preparada como se describe en el punto 6.2.1.1, realizando una fermentación en estado sólido con una humedad de 70%. Los respectivos alimentos se incubaron en el horno de aire a 35°C durante 24 h. El resto del proceso de elaboración y análisis de alimentos se realizó como se menciona en el punto 6.2.2.1.

Tabla 2. Formulación (g kg⁻¹ dieta) y composición proximal (% base seca).

Ingrediente	C	Cb	A	Ab	M	Mb
Harina de pescado ^a	130	130	130	130	130	130
Harina de ave ^b	220	220	220	220	220	220
Harina de soya ^b	300	300	300	300	300	300
Harina de trigo ^c	234	234	--	--	117	117
<i>Egrecia sp.</i>	--	--	71	71	35.5	35.5
<i>Macrocystis sp.</i>	--	--	71	71	35.5	35.5
<i>Sargassum sp.</i>	--	--	71	71	35.5	35.5
Sorgo	50	50	--	--	25	25
<i>U. lactuca</i>	--	--	71	71	35.5	35.5
<i>Bacillus safensis</i> (CFU g ⁻¹)		6x10 ⁷		6x10 ⁷		6x10 ⁷
Lecitina de soya ^d	25	25	25	25	25	25
Ac. de pescado ^a	25	25	25	25	25	25
Alginato de sodio ^e	10	10	10	10	10	10
Mezcla vitaminas ^f	2	2	2	2	2	2
Mezclaminerales	2	2	2	2	2	2
Vitamina C ^g	1	1	1	1	1	1
Cloruro de colina ^e	1	1	1	1	1	1
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Composición proximal (% en materia seca)						
Proteína	40.1±0.02	39.6±0.02	40.3±0.04	40.6±0.02	40.0±0.01	39.9±0.04
Lípidos	9.23±0.03	9.30±0.00	9.23±0.03	8.68±0.03	8.83±0.03	9.22±0.03
Fibra cruda	0.77± 0.06	0.37±0.06	2.10±0.00	1.37±0.06	1.23±0.06	0.73±0.06
Cenizas	10.3±0.03	12.3±0.03	20.6±0.05	22.5±0.04	16.5±0.05	18.0±0.06
ELN	39.61	38.44	27.72	26.85	33.44	32.14

^a PMA S.A. de C.V., Jalisco, MX.

^b PIASA S.A. de C.V., Baja California Sur, MX.

^c Molino San Cristóbal, Sonora, MX.

^d Cedrosa SA de CV, Estado de México, MX.

^e Sigma Aldrich, Missouri, US.

^f Premezcla vitamínica y mineral

^g Prilabsa, Sinaloa, MX

6.5.2 Bioensayo de crecimiento con camarón

Para la evaluación del rendimiento productivo de los alimentos formulados, se realizó un bioensayo de 6 semanas de cultivo para evaluar los seis tratamientos se emplearon tanques de 50 L bajo condiciones controladas de laboratorio ($37 \text{ ups a } 28^{\circ}\text{C} \pm 0.5$). Cada tratamiento consistió en 3 réplicas con 8 organismos (peso húmedo promedio inicial de $1.25 \pm 0.01 \text{ g}$) distribuidos aleatoriamente y aireación continua. Durante el experimento se monitoreó calidad de agua en términos de amonio, nitritos, nitratos, fosfato y pH (API Marine Saltwater Master Test Kit®, FI, EE. UU.) Se alimentó a saciedad partiendo con el 10% de biomasa de camarón dividida en dos raciones (09:00 y 14:30 h), se realizaron recambios de agua cada dos días del 20% y biometrías cada dos semanas. Además, se evaluó el rendimiento productivo de los camarones en términos de crecimiento, supervivencia, eficiencia de utilización de alimento y se recolectaron muestras para determinación de actividad enzimática digestiva, por efecto de los diferentes alimentos experimentales. Los parámetros zootécnicos se calcularon con las mismas fórmulas que se utilizaron para el bioensayo anterior.

6.5.3 Actividad enzimática digestiva

La determinación de la actividad enzimática de las proteasas se realizó con el análisis de la tripsina y quimotripsina siguiendo la metodología descrita por Toledo *et al.*, (2011), con ligeras modificaciones. La actividad tripsina se evaluó utilizando Boc-Gln-Ala-Arg-7 amido-4- clorhidrato de metilcumarina (Sigma B4153) como sustrato, mientras que para la quimotripsina se empleó N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amido-4-metilcumarina (Sigma S9761). En ambos casos, los sustratos se prepararon a una concentración final de 0.8 mmol L^{-1} en dimetilsulfóxido (DMSO), utilizando como medio de reacción un buffer Tris-HCl 50 mmol L^{-1} con CaCl_2 10 mmol L^{-1} a pH 8.0. Las mezclas se incubaron a 37°C y la fluorescencia se registró a una emisión de 460 nm con una excitación de 355 nm.

La actividad lipasa se midió utilizando heptanoato de metilumbeliferilo (Sigma M251) como sustrato, preparado a 50 mmol L^{-1} en DMSO, de buffer de fosfatos 0.1 M a pH 8.0. Las lecturas de fluorescencia se tomaron igualmente a 460 nm con excitación a 355 nm.

La actividad amilasa se determinó de acuerdo con el método propuesto por Métails y Bieth (1968). Para ello, se utilizó almidón como sustrato (3 g L^{-1}) disuelto en un tampón de NaH_2PO_4 0.06 M a pH 7.4. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de una solución de yodo, y la absorbancia se midió a 580 nm .

El contenido proteico total se cuantificó mediante el método de Bradford (1976), empleando albúmina sérica bovina (BSA, Sigma A7906) como estándar de referencia.

6.5.4 Análisis estadísticos

Los datos fueron evaluados para determinar normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene, respectivamente. Posteriormente, de acuerdo al diseño experimental de cada bioensayo, se aplicó un ANOVA de una o dos vías ($\alpha = 0.05$), seguido de la prueba de Tukey cuando fue necesario, para comparar el efecto de los tratamientos. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R (R Core Team), versión 4.2.2.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de las cepas de *Bacillus safensis*

7.2 Aislamiento y caracterización

El *Bacillus safensis* utilizado en este estudio fue aislado de una esponja marina (Galicia-Nicolás et al., 2018) y presentó inicialmente dos morfotipos coloniales distintos, uno grande (BS1-A) y uno pequeño (BS1-B). Ambos morfotipos fueron evaluados bajo condiciones experimentales idénticas y todos los procedimientos se aplicaron de manera uniforme. Para verificar que los morfotipos correspondían a variantes fenotípicas naturales y no a mutantes o contaminantes, se realizó la secuenciación completa del genoma en el laboratorio Plasmidsaurus (San Francisco, EE. UU.), complementada con un perfil metabólico bioquímico. Las bacterias se cultivaron en agar soya tripticaseína suplementado con 2.5% de NaCl (TSA+) a 35 °C durante 24 h. Las células fueron recolectadas por centrifugación (3,600 g, 4 °C, 10 min), ajustadas a una densidad óptica de $OD_{600} = 1$ en solución salina al 2.5% de NaCl, y cuantificadas como unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) mediante siembra de diluciones seriadas en TSA+.

7.2.1 Pruebas bioquímicas

Los análisis bioquímicos permitieron identificar diferencias metabólicas y fisiológicas significativas entre los morfotipos BS1-A y BS1-B. Tal como se muestra en la Tabla 3, ambos morfotipos presentaron perfiles generales semejantes en varias pruebas clásicas, pero también exhibieron características distintivas que permiten diferenciarlas a nivel intraespecífico. En primer lugar, ninguna de los morfotipos mostró movilidad ni producción de indol sin embargo, ambos resultaron positivos para ornitina, indicando actividad de la ornitina descarboxilasa, y positivos para catalasa, lo que confirma su capacidad de descomponer peróxidos. En contraste, fueron oxidasa negativos y rojo de metilo negativos, resultados que sugieren rutas fermentativas particulares y ausencia de ciertas enzimas del transporte electrónico, de acuerdo con la comparación con los controles (*E. coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Staphylococcus aureus*). Por otra parte, otra diferencia bioquímica relevante entre los morfotipos se observó en la prueba de citrato de Simmons, donde únicamente BS1-A mostró crecimiento y alcalinización del medio, mientras que BS1-B fue negativo. Esto indica que el morfotipo BS1-A posee la capacidad de utilizar

citrato como fuente única de carbono, lo cual constituye un rasgo metabólico diferencial dentro de la especie *Bacillus safensis*.

En cuanto al aprovechamiento de carbohidratos, ambos exhibieron un patrón altamente versátil, siendo positivos en la fermentación de todas las fuentes de carbono evaluadas (glucosa, lactosa, manitol, sorbitol, arabinosa, trehalosa, xilosa, galactosa y maltosa). Este perfil fermentativo amplio sugiere una elevada adaptabilidad metabólica, característica que puede conferir ventajas competitivas en ambientes variables, como los encontrados en sistemas acuícolas.

Respecto a los parámetros de crecimiento, ambos morfotipos mostraron un comportamiento similar frente a variaciones de temperatura. Ninguna de las dos creció a 4 °C, pero ambos fueron capaces de crecer desde 15 °C hasta 45 °C, evidenciando un rango térmico compatible con organismos mesófilos de amplia tolerancia.

Finalmente, las diferencias más marcadas entre ambos morfotipos fue la tolerancia a la salinidad. Ambas crecieron adecuadamente entre 0% y 6% de NaCl, pero solo BS1-A mantuvo crecimiento en 8% y 10% de NaCl, mientras que BS1-B resultó negativo en ambas concentraciones. Ninguna de las dos morfotipos creció a 13% de NaCl. Estos hallazgos indican que BS1-A posee una mayor tolerancia osmótica, lo cual podría reflejar adaptaciones ecológicas específicas o divergencias genéticas asociadas a mecanismos de homeostasis iónica.

En conjunto, los resultados bioquímicos permiten concluir que, aunque BS1-A y BS1-B comparten un núcleo metabólico característico de *Bacillus safensis*, cabe señalar que también presentan diferencias fisiológicas relevantes particularmente en el uso del citrato y en la tolerancia a salinidad que apoyan la existencia de variabilidad intraespecífica y pueden tener implicaciones funcionales en su desempeño en ambientes acuícolas.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas de las cepas.

Prueba	Morfotipo			CONTROLES		
	BS1-A	BS1-B	BLANCO	<i>E. coli</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>
MOVILIDAD	-	-	/	+	+	-
INDOL	-	-	/			-
ORNITINA	+	+	/	+	+	-
CITRATO DE SIMMONS	+	-	/	-	+	-
CATALASA	+	+	/	NA	NA	+
OXIDASA	-	-	/	-	NA	NA
ROJO DE METILO	-	-	/	+	-	NA
FERMENTACIÓN HIDRATOS DE CARBONO:						
1. Glucosa	+	+	/	NA	NA	NA
2. Lactosa	+	+	/	NA	NA	NA
3. Manitol	+	+	/	NA	NA	NA
4. Sorbitol	+	+	/	NA	NA	NA
5. Arabinosa	+	+	/	NA	NA	NA
6. Trehalosa	+	+	/	NA	NA	NA
7. Xilosa	+	+	/	NA	NA	NA
8. Galactosa	+	+	/	NA	NA	NA
9. Maltosa	+	+	/	NA	NA	NA
RANGO DE TEMPERATURA:						
4°C	-	-	/	NA	NA	NA
15°C	+	+	/	NA	NA	NA
25°C	+	+	/	NA	NA	NA
30°C	+	+	/	NA	NA	NA
35°C	+	+	/	NA	NA	NA
45°C	+	+	/	NA	NA	NA
RANGO DE NaCl:						

0%	+	+	/	NA	NA	NA
3%	+	+	/	NA	NA	NA
6%	+	+	/	NA	NA	NA
8%	+	-	/	NA	NA	NA
10%	+	-	/	NA	NA	NA
13%	-	-	/	NA	NA	NA

NA: No Aplica; /: Blanco; - Negativo; +: Positivo; *Bacillus safensis*^a *Bacillus safensis*^b

Por medio de la Tinción de Gram se determinó que los morfotipos BS1-A y BS1-B son Gram + y con morfología de bastón (Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización morfológica de las cepas.

Clave	Especie	Forma	Borde	Elevación	Color	Morf. Celular	Gram
BS1-A ^a	<i>Bacillus safensis</i>	Puntiforme	Entero	Plana	Lisa, brillante	Bacilo mediano y esporas	+
BS1-B ^b	<i>Bacillus safensis</i>	Puntiforme	Entero	Plana	Lisa, brillante	Bacilo mediano	+

Bacillus safensis^a *Bacillus safensis*^b

7.3 Determinación cualitativa de actividad de enzimas digestivas

Las pruebas de determinación de enzimas extracelulares realizadas en los morfotipos BS1-A y BS1-B evidenciaron la capacidad de ambos para producir las enzimas proteasas y celulasas, lo que sugiere su potencial para la degradación de proteínas y polisacáridos estructurales (Tabla 5).

Tabla 5. Producción de enzimas extracelulares (proteasa, amilasa y celulasa) de las cepas.

Prueba	Cepas		
	BS1-A ^b	BS1-B ^c	BLANCO
Hidrólisis de gelatina	+	+	/
Hidrólisis de almidón	-	-	/
Hidrólisis de celulosa	+	+	/

7.4 Curva de crecimiento de las cepas

En la Fig. 1 se presenta la dinámica de crecimiento de las cepas *Bacillus safensis* BS1-A y BS1-B durante 48 h de incubación en medio TSB suplementado con 2.5% de NaCl a 30 °C. Ambos morfotipos exhibieron un patrón de crecimiento típico de bacterias mesófilas bajo condiciones de salinidad moderada, caracterizado por una fase exponencial rápida en las primeras horas del cultivo, seguida de una aproximación gradual a la fase estacionaria. No obstante, se observaron diferencias entre ambos. El morfotipo BS1-A mostró un incremento inicial ligeramente más pronunciado, alcanzando valores de Ln (células mL⁻¹) cercanos a 20.3 alrededor de las 10 h, momento en el cual la tasa de crecimiento comenzó a disminuir. En comparación con BS1-B que presentó un ascenso inicial más gradual, pero superó a BS1-A en densidad celular hacia las 12–15 h, manteniendo valores superiores de manera sostenida durante el resto del experimento. Una vez alcanzada la fase estacionaria, ambos mostraron estabilidad en la concentración celular, aunque BS1-B alcanzó un nivel máximo ligeramente mayor, cercano a Ln ≈ 21.0, BS1-A se estabilizó alrededor de Ln ≈ 20.7. A lo largo de todo el periodo experimental no se observó disminución significativa en la densidad celular en ninguno de los morfotipos, lo cual indica que ambos poseen una buena capacidad para mantener la viabilidad bajo las condiciones evaluadas.

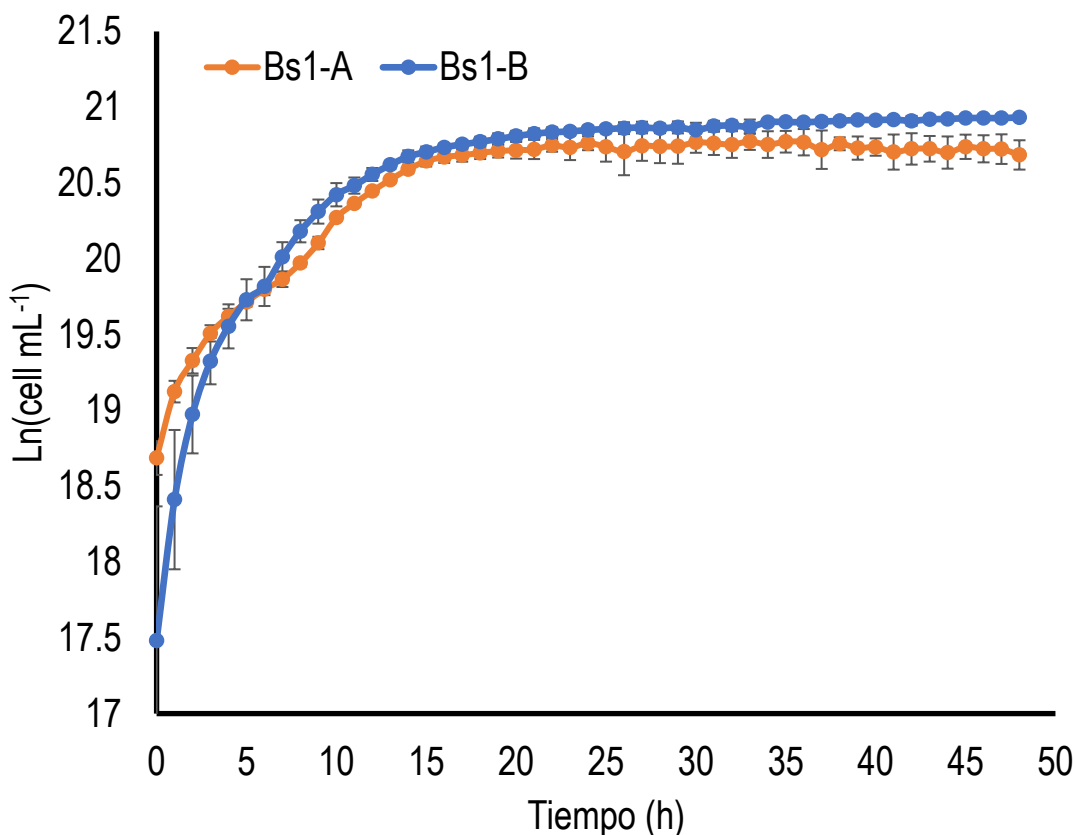


Figura 1. Curvas de crecimiento de los morfotipos de *Bacillus safensis* BS1-A y BS1-B durante 48 horas de incubación en medio TSB suplementado con 2.5% de NaCl a 30 °C. Los valores representan la media de tres réplicas biológicas \pm desviación estándar.

7.5 Ensayo de actividad antagónica mediante la técnica punto-punto (dot-spot)

Ambos morfotipos fueron evaluados por su actividad antagonista frente a tres especies patógenas del género *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. diabollicus* y *V. harveyi*). Los resultados indicaron que ambas cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de al menos una de las especies de *Vibrio* evaluadas; sin embargo, el morfotipo BS1-A destacó por presentar una fuerte actividad antagonista frente a las tres especies de *Vibrio* analizadas (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad antagonista de los morfotipos BS1-A y BS1-B frente a tres bacterias patógenas del género *Vibrio*. DE: Desviación estándar.

<i>Bacillus safensis</i>	Diámetro de la zona de inhibición (media ± DE) (mm)		
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. diabolicus</i>	<i>V. harveyi</i>
1. BS1-A	22.3 ± 0.8	22.7 ± 0.6	24.23 ± 0.6
2. BS1-B	0	16.5 ± 0.5	4.3 ± 0.6
Control Cloranfenicol 30 µg	20.3 ± 0.7	19.3 ± 0.6	20.7 ± 1.1

7.6 Análisis bioinformático de las cepas *Bacillus safensis* BS1-A y BS1-B

El genoma del morfotipo BS1-A fue depositado en la base de datos del NCBI (BioProjectID: PRJNA1363193) y consta de 3,686,099 pb, con un contenido de GC del 41.76 % (Fig. 2). La Identidad Nucleotídica Promedio (ANI) entre los morfotipos BS1-A y BS1-B, así como con el genoma de referencia de *Bacillus safensis*, cepa PgKB20 (NZ_CP043404.1), mostró un valor de ANI de 97.46. El genoma del segundo morfotipo fue secuenciado y mostró un valor de ANI de 99.999 entre *Bacillus safensis* BS1-A y BS1-B. Tras la secuenciación, el número de lecturas fue de 157,576, con un rN50 de 3,651 pb y una cobertura de 98.13X.

Entre las características genómicas, se reconocieron genes de fagos que codifican una terminasa, proteínas estructurales y holinas mediante dos programas diferentes, PHASTest y VirSorter, lo que aporta evidencia de la presencia de un profago en BS1-A. El análisis con antiSMASH encontró varios clústeres génicos asociados con la síntesis de metabolitos secundarios como lichenisina, plantazolicina y bacilisina. Sin embargo, al analizar la presencia de genes de resistencia a antibióticos mediante CARD y la base de datos NCBI Gene, ambos programas (RGI y ResFinder) identificaron el gen *cat86_1* en BS1-A, mostrando entre 90 y 100 % de identidad en otras cepas de *Bacillus* reportadas en NCBI. La anotación del genoma identificó 3,709 genes. Entre las características genómicas, se identificaron genes relacionados con fagos que codifican una terminasa, proteínas estructurales y holinas, detectados mediante los programas PHASTest y VirSorter, lo que respalda la presencia de un profago en BS1-A. El análisis con antiSMASH reveló varios clústeres génicos asociados con la biosíntesis de metabolitos secundarios como lichenisina,

plantazolicina y bacilisina. Por otra parte, la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos mediante las bases de datos CARD y NCBI Gene mostró que tanto RGI como ResFinder identificaron el gen *cat86_1* en BS1-A, el cual exhibe entre 90 y 100 % de identidad de secuencia con homólogos reportados en otras especies de *Bacillus* depositadas en NCBI.

Finalmente se generó un pangenoma en donde se compararon 36 cepas de *Bacillus safensis* de la base de datos NCBI con el morfotipo BS1-A, para la construcción del modelo de pangenoma. Los genes núcleo se emplearon para construir un árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud, el cual mostró que BS1-A se agrupa por separado del resto de las cepas, pero está estrechamente relacionado con *Bacillus safensis* cepa FUA2117 (Fig. 3), y presenta un conjunto de genes únicos anotados como proteínas hipotéticas. Dentro de los genes accesorios BS1-A que comparte con *Bacillus safensis* FUA2117 se identificó un clúster interesante de genes implicados en la remodelación de la pared celular, como *lytB* y *lytC_3*

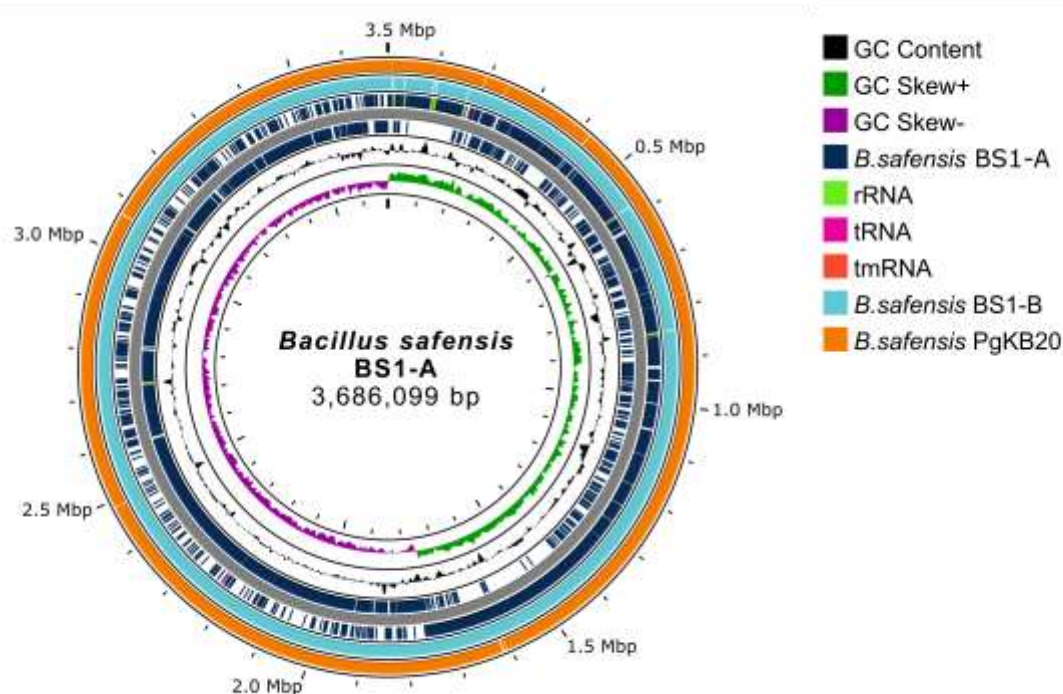


Figura 2. Representación circular del genoma de BS1-A. Desde el anillo externo hacia el centro: comparación BLAST con las secuencias de *Bacillus safensis* PgKB20 y BS1-B, los genes codificantes de BS1-A, el contenido genómico de G+C y la distribución del sesgo GC del genoma

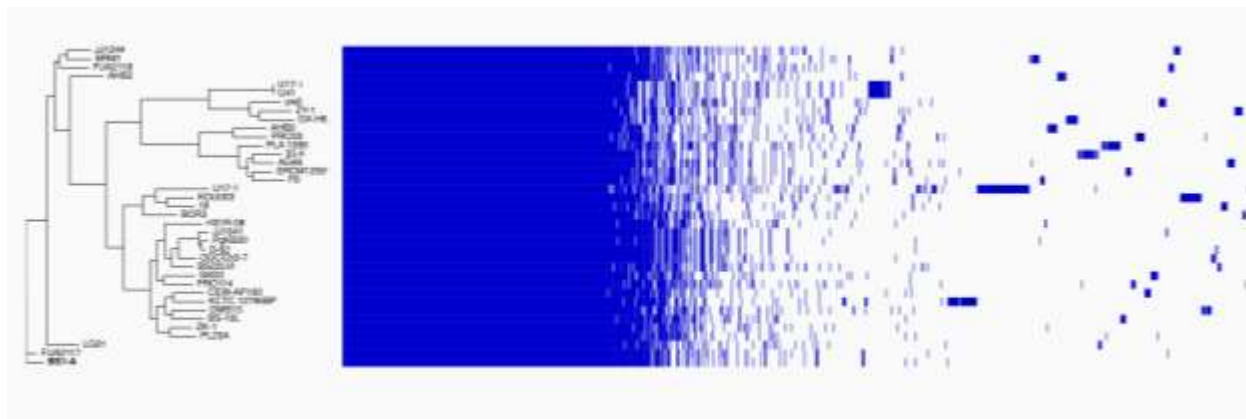


Figura 3. Análisis del pangenoma de 38 genomas de *Bacillus safensis*. El árbol filogenético de la izquierda se construyó en RAxML mediante el método de máxima verosimilitud, utilizando el alineamiento de genes núcleo obtenido con Roary. La distribución del pangenoma se visualiza en un mapa de calor, donde las filas corresponden a las cepas del árbol filogenético y las columnas representan grupos ortólogos específicos. La presencia genética se indica en azul y la ausencia se muestra en blanco.

7.7 Efecto de las cepas en la supervivencia de *Artemia salina*

El bioensayo realizado con quistes de *Artemia salina* permitió evaluar el posible impacto de los morfotipos BS1-A y BS1-B sobre la eclosión de nauplios durante las primeras 24 horas de incubación. De manera general, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y sus respectivos controles ($p > 0.05$), lo que indica que ninguna de los dos morfotipos afectó el proceso de eclosión bajo las concentraciones evaluadas. La Tabla 7 muestra los valores individuales y las medias asociadas a la eclosión tras la exposición a diferentes concentraciones de BS1-A (1, 10, 100 y 1000 μL). Las medias oscilaron entre 9.33 ± 0.58 y 12.67 ± 3.06 organismos eclosionados, siendo comparables al control (12 ± 2.65). Donde a pesar de ligeras variaciones inter-replicado, por ejemplo, una reducción moderada a 9.33 nauplios en el tratamiento de 100 μL y un ligero incremento a 12.67 nauplios en 1000 μL , dichas fluctuaciones se encuentran dentro del rango esperado por variabilidad biológica natural. El análisis estadístico confirmó esta tendencia, obteniéndose un valor de $p = 0.40$, el cual sostiene que las diferencias no son significativas y no pueden atribuirse al efecto de la cepa BS1-A. De manera similar, los resultados para BS1-B (Tabla 8) muestran medias de eclosión que van de 14.33 ± 0.58 a 16.67 ± 4.04 , ligeramente superiores al control (12.67 ± 0.58), pero sin alcanzar niveles de significancia estadística ($p = 0.34$). Particularmente, el tratamiento con 100 μL mostró un incremento aparente

en el número de nauplios eclosionados (16.67 nauplios), el cual podría deberse a variabilidad experimental o a una posible estimulación no significativa del proceso de eclosión. No obstante, el análisis estadístico indica que esto no representa un efecto biológico atribuible al morfotipo BS1-B, sino simplemente una variación natural entre réplicas.

Tabla 7. Número de organismos de *Artemia franciscana* eclosionados después de 24 h con BS1-A.

BS1-A					
	Control	1 μ L	10 μ L	100 μ L	1000 μ L
	9	14	11	9	16
	13	10	14	9	10
	14	8	13	10	12
Media \pm SD	12 \pm 2.65	10.67 \pm 3.06	12.67 \pm 1.53	9.33 \pm 0.58	12.67 \pm 3.06

Tabla 8. Número de organismos de *Artemia franciscana* eclosionados después de 24 h con BS1-B.

BS1-B					
	Control	1 μ L	10 μ L	100 μ L	1000 μ L
	12	14	16	16	14
	13	14	16	13	13
	13	15	13	21	17
Media \pm SD	12.67 \pm 0.58	14.33 \pm 0.58	15 \pm 1.73	16.67 \pm 4.04	14.67 \pm 2.08

7.8 Evaluación *in vivo* del efecto de la aplicación de *Bacillus safensis* (en agua de cultivo, alimento y alimento pre-digerido)

7.8.1 Evaluación *in vivo* del uso de *Bacillus safensis* (BS1-A y BS1-B) en el agua de cultivo de camarón

7.8.2 Análisis proximal de harinas

El análisis proximal de las harinas vegetales utilizadas en este trabajo (Tabla 9), indican que las harinas con mayor porcentaje de proteína son harina de Soya, *Ulva*, *Egrecgia* y trigo (50.29, 17.23,

11.05 y 10.26%, respectivamente). Las harinas con menor porcentaje de proteína son Sorgo, *Sargassum* y *Macrocystis* (4.73, 5.54 y 6.13%, respectivamente).

Tabla 9. Análisis proximal de harinas de origen vegetal antes del proceso de valorización.

Ingrediente	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto Etéreo (%)	Fibra Cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)
Soya	7.73±0.03	50.29±0.05	0.43±0.03	1.96±0.06	7.17±0.03	40.15
Sorgo	11.66±0.03	4.73±0.04	3.02±0.03	1.33±0.06	1.56±0.03	89.36
Trigo	9.88±0.03	10.26±0.03	1.33±0.03	2.06±0.06	1.87±0.03	84.48
<i>Ulva</i>	10.08±0.06	17.23±0.02	0.25±0.05	1.40±0.00	37.53±0.02	43.59
<i>Sargassum</i>	7.66±0.06	5.54±0.01	0.33±0.03	7.63±0.06	33.03±0.03	53.47
<i>Macrocystis</i>	8.14±0.05	6.13±0.02	0.18±0.03	6.53±0.06	46.17±0.00	40.99
<i>Egrecia</i>	9.61±0.03	11.05±0.03	0.25±0.05	8.20±0.00	35.19±0.02	45.31

Los valores expresados en la tabla representan las medias de los replicados ± error estándar de 3 réplicas. Resultados expresados en base seca, excepto humedad.

7.8.3 Bioensayo de crecimiento con camarón

Se observaron diferencias significativas en términos de peso final ($p = 0.020$) y ganancia en peso ($p = 0.020$) entre los tratamientos (Fig. 4). En donde el tratamiento BAC presentó mayor crecimiento y consumo individual de alimento, en comparación con el tratamiento Control y COM. En cuestión de supervivencia, los tratamientos Control y BAC presentaron 96% de supervivencia al final del periodo experimental, a diferencia del tratamiento COM donde la supervivencia fue menor (93%) pero sin presentar diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros zootécnicos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia, de camarones *Penaeus vannamei* después de 42 días con bajo recambio de agua y aplicación de bacterias probióticas experimentales (BAC) y comerciales (COM).

Tratamiento	TC (%)	TCE (% día ⁻¹)	CI (g)	S (%)
Control	898±10 ^a	5.48±0.02 ^a	6.61±0.02	96±3
BAC	998±30 ^b	5.70±0.07 ^b	7.00±0.13	96±3
COM	978±23 ^{ab}	5.66±0.05 ^{ab}	6.95±0.11	93±4

Los valores expresados en la tabla representan las medias de los replicados ± error estándar.

Las letras diferentes representan las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos al realizar una prueba de Tukey.

Donde: TC = tasa de crecimiento; TCE = tasa de crecimiento específico; CI = consumo individual; S = supervivencia.

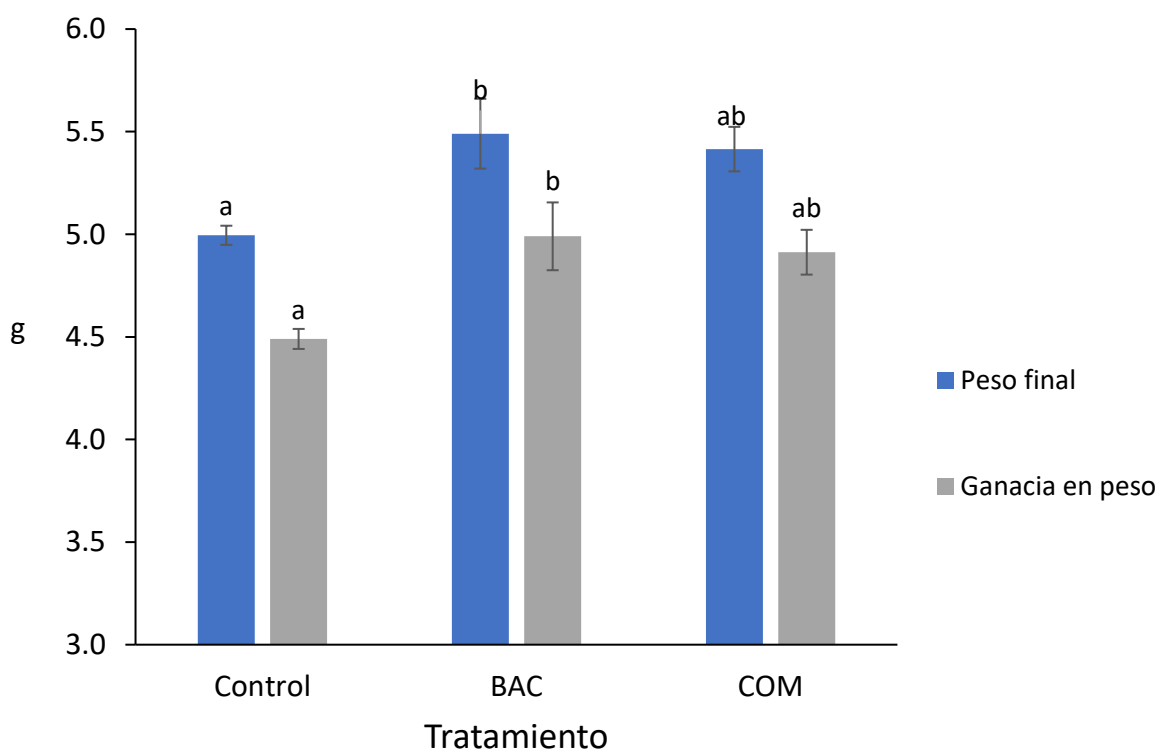


Figura 4. Peso final y ganancia en peso de camarones *Penaeus vannamei* después de 42 días de bioensayo con bajo recambio de agua y aplicación de bacterias probióticas experimentales (BAC) y comerciales (COM). Las letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos al realizar una prueba de Tukey ($p < 0.05$, $n=4$).

Además, se observaron diferencias significativas en el factor de conversión alimenticia (FCA) al terminar el periodo experimental. El tratamiento con menor FCA fue BAC ($p = 0.030$), indicando

un uso más eficiente del alimento en comparación con los tratamientos COM y Control respectivamente.

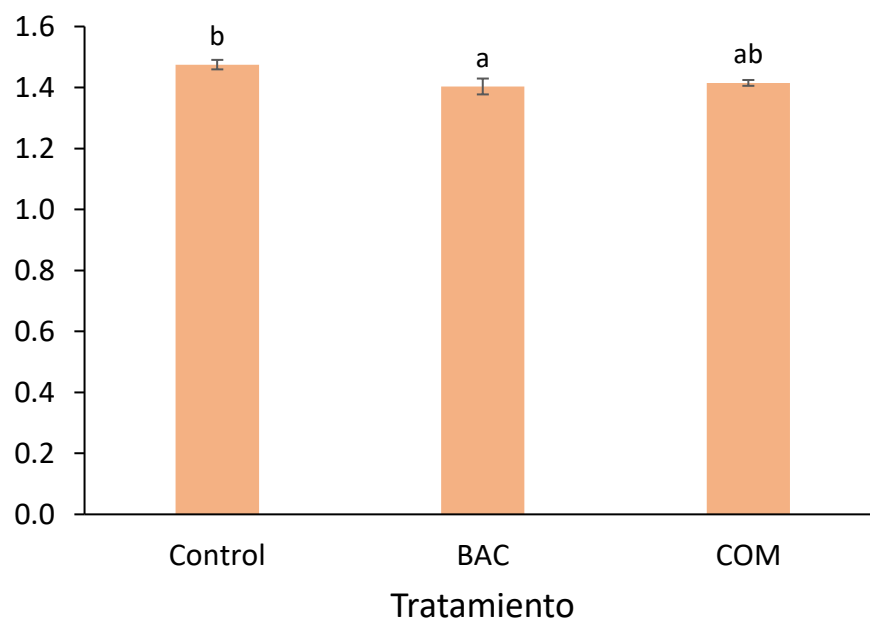


Figura 5. Factor de conversión alimenticia de camarones *Penaeus vannamei* después de 42 días de bioensayo con bajo recambio de agua y aplicación de bacterias probióticas experimentales (BAC) y comerciales (COM). Las letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos al realizar una prueba de Tukey ($p = 0.030$, $n=4$).

7.8.4 Parámetros de calidad del agua

En cuanto al análisis de calidad de agua durante el experimento (Fig. 6), en los tratamientos BAC y COM con el uso de bacterias, se observó una menor concentración de amonio total, nitratos y solidos sedimentables a la sexta semana de cultivo comparado con el grupo control ($p < 0.05$).

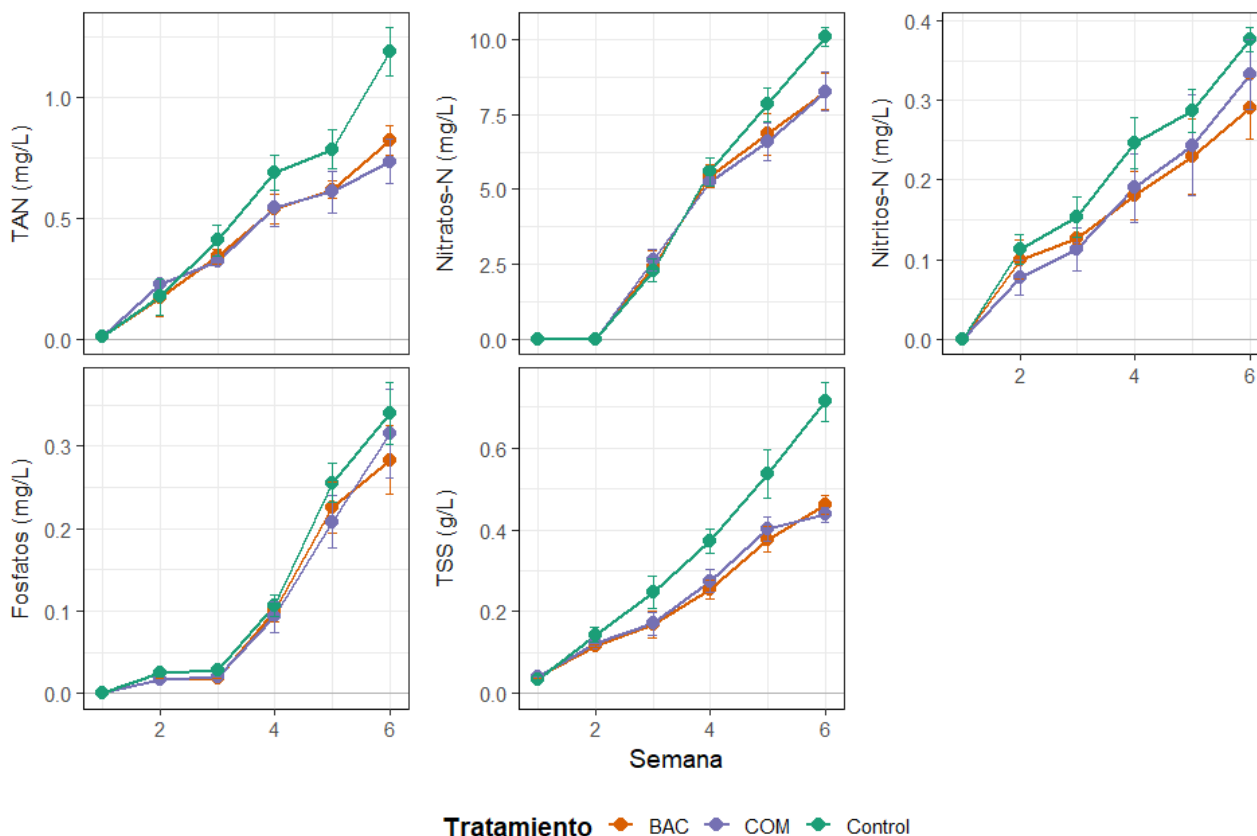


Figura 6. Análisis de amonio total (TAN), nitritos, nitratos, fosfatos y total de solidos sedimentables.

7.9 Efecto de *Bacillus safensis* (BS1-A y BS1-B) adicionado en el alimento sobre el cultivo de camarón

En el presente estudio se evaluaron los efectos de 6 tratamientos (C1, CB, A1, AB, M1 y MB) sobre diferentes parámetros. Los resultados promedio en conjunto con sus desviaciones estándar, mostraron diferencias entre tratamientos (Tabla 11). El tratamiento C1 presentó el valor más alto de TC (%) (545 ± 145), mientras que AB mostró el valor más bajo (392 ± 9), pero ninguno de los factores (formula o bacterias) ni la interacción fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$). En cuanto a la TCE (% día⁻¹), los valores oscilaron entre 6.37 ± 0.74 (C1) y 5.50 ± 0.06 (AB), siendo el factor fórmula significativo ($p = 0.047$), mientras que las bacterias ($p = 0.112$) y la interacción ($p = 0.429$) no mostraron efectos significativos. El consumo individual (CI g) se mantuvo constante entre los tratamientos sin presentar diferencias significativas por efecto de alguna de las variables o su interacción ($p > 0.05$).

En términos de supervivencia (S%), esta fue alta en todos los tratamientos, alcanzando $100 \pm$ en los tratamientos CB, A1, AB y M1, y mostrando una ligera disminución en C1 (98 ± 4) y MB (96 ± 4) ($p > 0.05$).

Tabla 11. Parámetros zootécnicos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia, de camarones *Penaeus vannamei* después de 29 días de alimentación con diferentes fórmulas. Alimento de referencia (C1), Alimento de referencia + *Bacillus safensis* 5×10^7 CFU g^{-1} (CB), Mezcla de algas (A1), Mezcla de algas digeridas + *Bacillus safensis* 5×10^7 CFU g^{-1} (AB), Mix de harinas vegetales y algas (M1), Mix de harinas vegetales y algas + *Bacillus safensis* 5×10^7 CFU g^{-1} (MB).

Tratamiento	TC (%)	TCE (% día ⁻¹)	CI (g)	S (%)
C1	545.2 \pm 145.5	6.37 \pm 0.74	0.99 \pm 0.02	98 \pm 4
CB	438.5 \pm 44.1	5.80 \pm 0.28	0.99 \pm 0.02	100 \pm 0
A1	401.8 \pm 28.6	5.56 \pm 0.19	0.99 \pm 0.02	100 \pm 0
AB	392.6 \pm 8.9	5.50 \pm 0.06	0.98 \pm 0.02	100 \pm 0
M1	448.2 \pm 30.3	5.86 \pm 0.19	0.99 \pm 0.02	100 \pm 0
MB	417.4 \pm 3.3	5.67 \pm 0.02	0.99 \pm 0.02	96 \pm 4
<i>P</i> -valor ANOVA de dos vías				
Bacterias	0.133	0.112	0.967	0.493
Formula	0.072	<0.047	0.998	0.262
Interacción	0.415	0.429	0.999	0.063

Los valores expresados en la tabla representan las medias de los replicados \pm desviación estándar.

Donde: TC = tasa de crecimiento; TCE = tasa de crecimiento específico; CI = consumo individual; S = supervivencia.

La Fig. 7 muestra la comparación entre el peso final y la ganancia en peso entre seis tratamientos (CB, C1, AB, A1, MB y M1). Se observó que el tratamiento C1 presentó el mayor peso final (1.03 g), aunque con una variabilidad considerable, mientras que su ganancia en peso fue de 0.87 g. Por otro lado, el tratamiento M1 también mostró valores relativamente altos, con un peso final de 0.88 g y una ganancia en peso de 0.72 g. En los tratamientos CB, AB, A1 y MB, los valores de peso final y ganancia en peso fueron más homogéneos, con pesos finales cercanos a 0.8 g y ganancias en peso alrededor de 0.6 a 0.7 g. Sin embargo, al realizar un ANOVA de dos vías, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para las variables evaluadas (Bacterias, Fórmula e Interacción) ($p > 0.05$), lo que sugiere que los tratamientos no influyeron de manera significativa en el peso final ni en la ganancia en peso. En resumen, aunque los

tratamientos C1 y M1 mostraron tendencias a mayores valores de peso final, los resultados no fueron estadísticamente significativos.

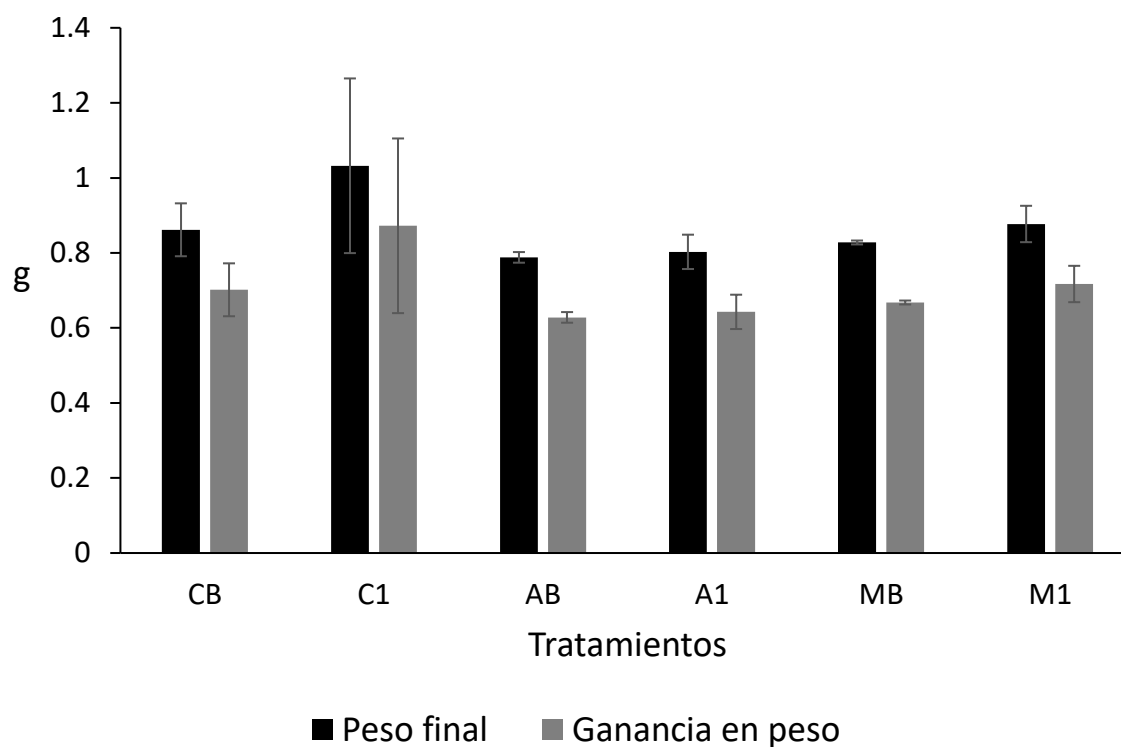


Figura 7. Promedio peso final y ganancia en peso de camarones *Penaeus vannamei* después de 29 días alimentados con diferentes fórmulas. Alimento de referencia (C1), Alimento de referencia + *Bacillus safensis* 5×10^7 CFU g^{-1} (CB), Mezcla de algas (A1), Mezcla de algas digeridas + *Bacillus safensis* 5×10^7 CFU g^{-1} (AB), Mix de harinas vegetales y algas (M1), Mix de harinas vegetales y algas + *Bacillus safensis* 5×10^7 CFU g^{-1} (MB). ANOVA de dos vías ($p < 0.05$, $n = 3$); no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para las variables evaluadas.

La Fig. 8 muestra el Factor de Conversión Alimenticia (FCA) de seis tratamientos (CB, C1, AB, A1, MB y M1) utilizados durante 29 días en juveniles de camarón blanco. Los promedios variaron entre 1.19 (tratamiento C1) y 1.57 (tratamiento AB), siendo el tratamiento AB el de valor más alto y menor desviación estándar (0.028). El tratamiento C1 presentó el promedio más bajo (1.19) pero mayor desviación estándar (0.306). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías mostró que el efecto de las bacterias no fue significativo ($p = 0.112$), mientras que la fórmula utilizada sí influyó de manera significativa en los resultados ($p = 0.047$). Asimismo, no se encontró una interacción significativa entre bacterias y fórmula ($p = 0.430$), lo que indica que el efecto de un factor no depende del otro.

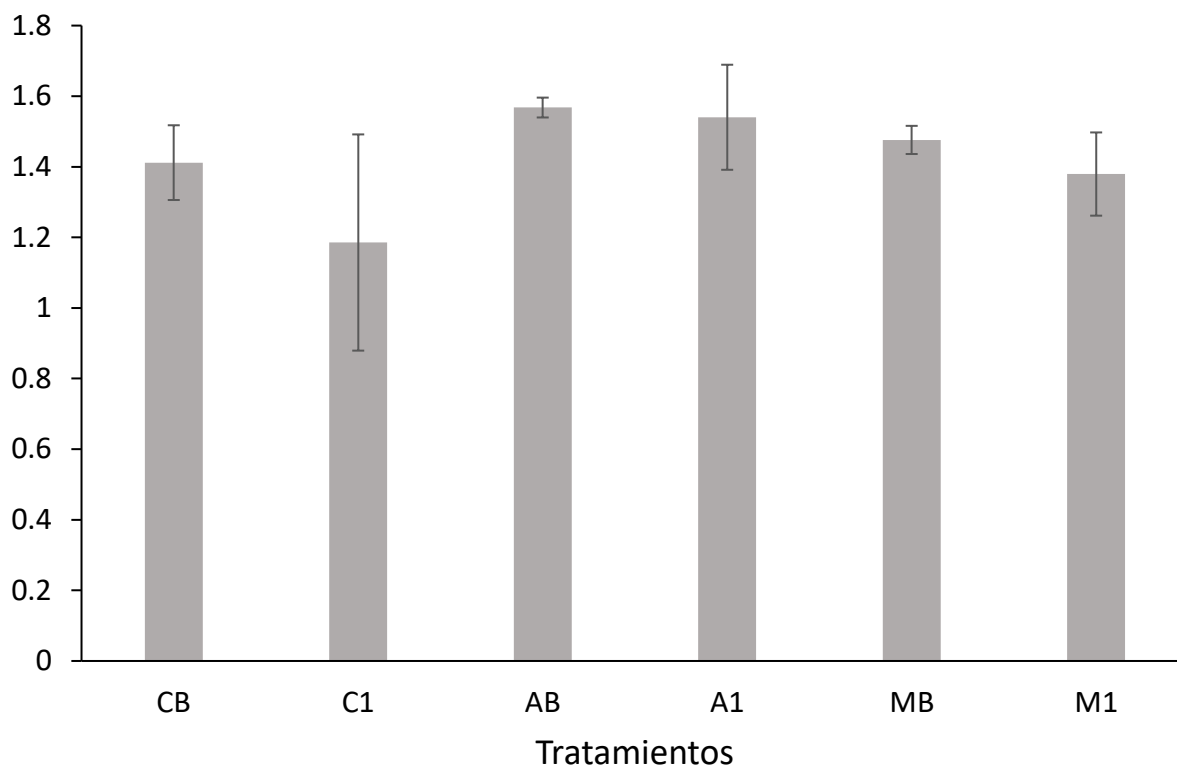


Figura 8. Factor de conversión alimenticia de camarones *Penaeus vannamei* después de 29 días alimentados con diferentes fórmulas. Alimento de referencia (C1), Alimento de referencia + *Bacillus safensis* 5×10^7 CFU g^{-1} (CB), Mezcla de algas (A1), Mezcla de algas digeridas + *Bacillus safensis* 5×10^7 CFU g^{-1} (AB), Mix de harinas vegetales y algas (M1), Mix de harinas vegetales y algas + *Bacillus safensis* 5×10^7 CFU g^{-1} (MB). ANOVA de dos vías ($p < 0.05$, $n=3$) ; no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para las variables evaluadas.

7.10. Uso de *Bacillus safensis* (BS1-A y BS1-B) en la predigestión por fermentación del alimento y su efecto en el cultivo de camarón

La Tabla 12 muestra los resultados promedio (\pm desviación estándar) para cada parámetro evaluado. La tasa de crecimiento (TC) vario entre 425.1 ± 11.0 y 404.2 ± 14.4 para todos los tratamientos siendo Ab el de mayor crecimiento, pero sin presentar diferencias significativas con el resto de tratamientos. En cuanto a la tasa de crecimiento específica (TCE), los valores variaron entre 3.8 ± 0.1 (tratamiento M) y 3.9 ± 0.0 (tratamiento Ab). El consumo (CI) varió entre 9.0 ± 0.2 (Cb) y 10.0 ± 0.0 (M). Por último, la supervivencia (S) fue cercana al 100% para todos los tratamientos, excepto M y Mb, que mostraron valores de 91.7 ± 8.8 y 91.7 ± 14.4 , respectivamente.

El análisis de varianza de dos vías no detectó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros evaluados. Los p-valores para los efectos principales (predigestión y fórmula) y su interacción fueron mayores a 0.05 en todos los casos.

Tabla 12. Parámetros zootécnicos de crecimiento, consumo de alimento y supervivencia, de camarones *Penaeus vannamei* después de 42 días alimentados con diferentes fórmulas. C (Alimento de referencia), Cb (Alimento de referencia digerido por *Bacillus safensis*), A (Mix de algas), Ab (Mix de algas digerido por *Bacillus safensis*) M (Mix de algas y harinas vegetales) y Mb (Mix de algas y harinas vegetales predigeridas por *Bacillus safensis*).

Tratamiento	TC (%)	TCE (% día ⁻¹)	CI (g)	S (%)
C	412.7±33.2	3.9±0.2	9.9±0.2	95.8±0.0
Cb	416.9±14.5	3.9±0.1	9.0±0.2	100±0.0
A	419.5±12.4	3.9±0.1	9.9±0.0	100±8.8
Ab	425.1±11.0	3.9±0.0	9.2±0.2	100±0.0
M	404.2±14.4	3.8±0.1	10.0±0.0	91.7±8.8
Mb	424.2±28.9	3.9±0.1	9.3±0.02	91.7±14.4
<i>P</i> -valor ANOVA de dos vías				
Predigestión	0.896	0.841	0.569	0.690
Formula	0.419	0.404	0.107	0.157
Interacción	0.401	0.394	0.387	0.848

Los valores expresados en la tabla representan las medias de los replicados ± desviación estándar.

Donde: TC = tasa de crecimiento; TCE = tasa de crecimiento específico; CI = consumo individual; S = supervivencia.

La Fig. 9 muestra la comparación entre el peso final y la ganancia de peso de los seis tratamientos. Los valores promedio de peso final fueron de 6.3 ± 0.3 g (Tratamiento "M") el menor y 6.6 ± 0.1 g (Tratamientos Ab y Mb) los mayores, mientras que la ganancia de peso promedio varió de 5.1 ± 0.3 g a 5.3 ± 0.4 g. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de dos vías indicaron que los factores evaluados, como la adición de bacterias ($p=0.896$) y el tipo de fórmula utilizada ($p=0.419$), no tuvieron un impacto significativo en el peso final ni en la ganancia de peso. Asimismo, no se observó una interacción significativa entre ambos factores ($p=0.401$).

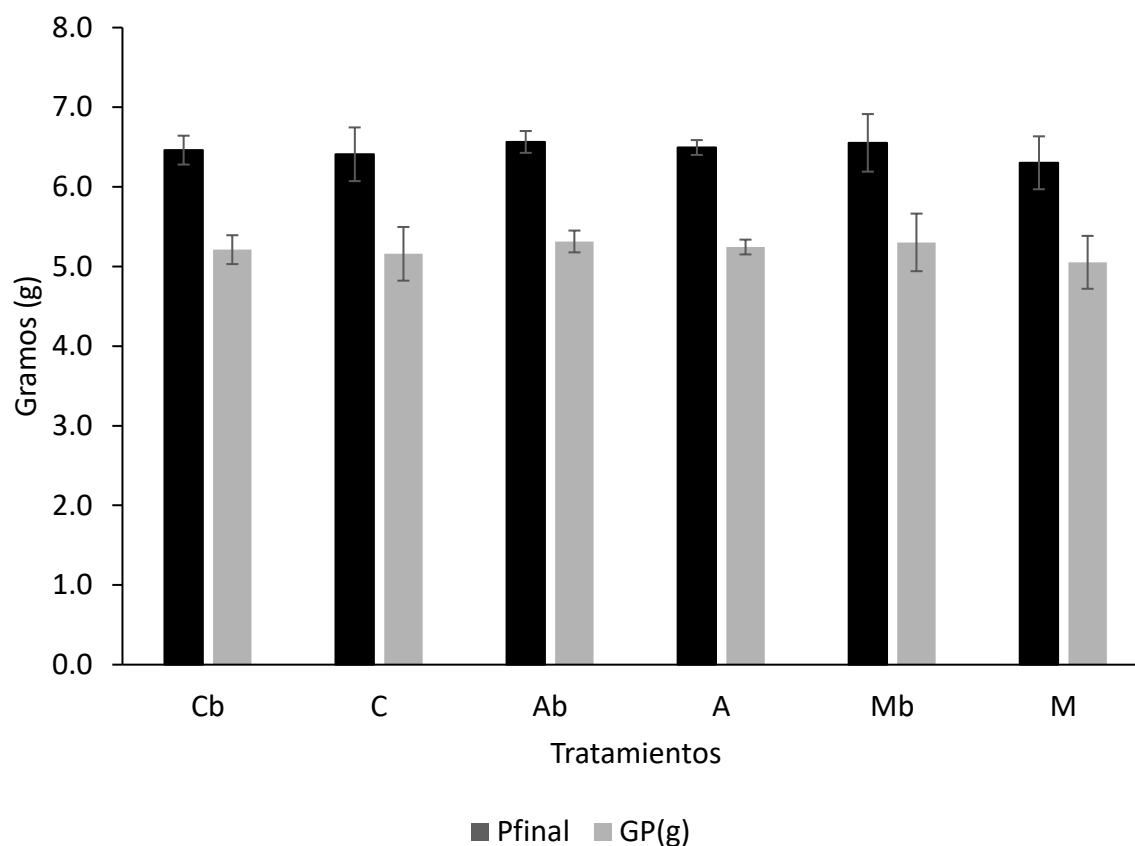


Figura 9. Promedio peso final y ganancia en peso de camarones *Penaeus vannamei* después de 42 días alimentados con diferentes fórmulas. C (Alimento de referencia), Cb (Alimento de referencia digerido por *Bacillus safensis*), A (Mix de algas), Ab (Mix de algas digerido por *Bacillus safensis*) M (Mix de algas y harinas vegetales) y Mb (Mix de algas y harinas vegetales digerido por *Bacillus safensis*). ANOVA de dos vías ($p < 0.05$, $n=3$); no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para las variables evaluadas.

En la Fig. 10 se presentan los valores promedio \pm desviaciones estándar del FCA de los tratamientos (C, Cb, A, Ab, M y Mb). Se observó que Cb y Ab fueron los tratamientos que presentaron menor FCA (1.7 ± 0.0) a diferencia del tratamiento M, el cual presentó el mayor valor (2.0 ± 0.1). Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para determinar el impacto de dos factores principales, bacterias y fórmula, así como su interacción para el parámetro FCA. Los resultados mostraron que ninguno de los factores individuales (bacterias, $p=0.853$, y fórmula, $p=0.524$) ni su interacción ($p=0.482$) tuvo un efecto significativo sobre los valores obtenidos.

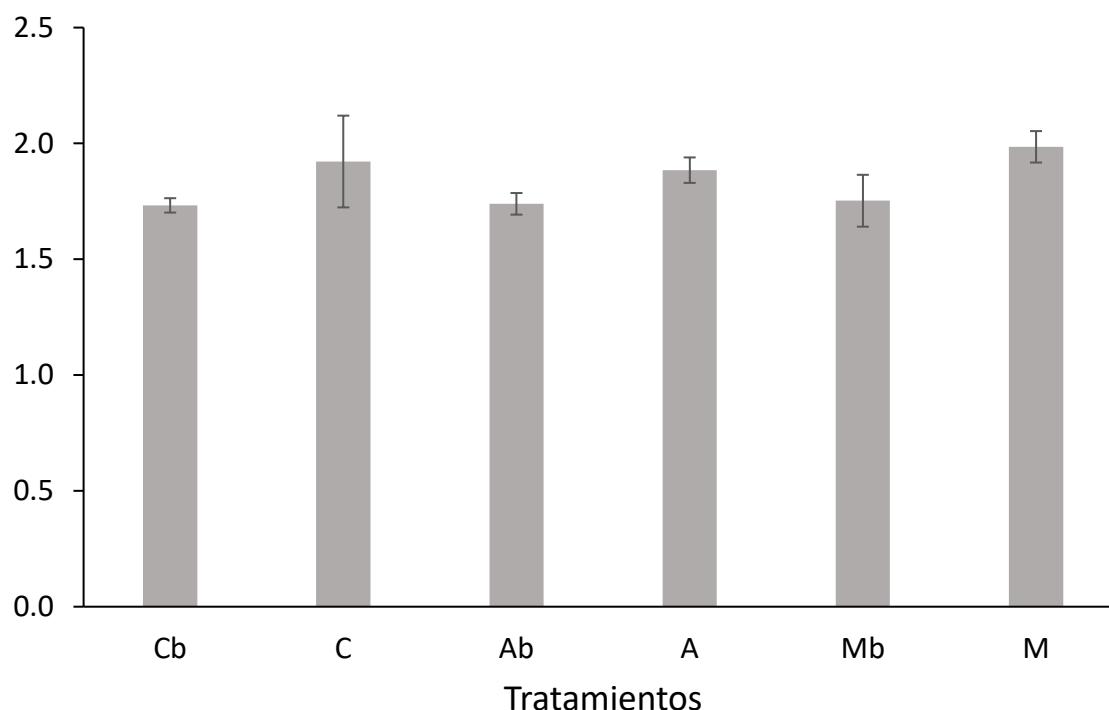


Figura 10. Factor de conversión alimenticia de camarones *Penaeus vannamei* después de 42 días alimentados con diferentes fórmulas. C (Alimento de referencia), Cb (Alimento de referencia digerido por *Bacillus safensis*), A (Mix de algas), Ab (Mix de algas digerido por *Bacillus safensis*) M (Mix de algas y harinas vegetales) y Mb (Mix de algas y harinas vegetales digerido por *Bacillus safensis*). ANOVA de dos vías ($p < 0.05$, $n=3$); no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para las variables evaluadas.

7.11 Actividad enzimática digestiva

Con respecto a la actividad enzimática digestiva en el hepatopáncreas de camarones juveniles, de acuerdo con el análisis estadístico de ANOVA de 2 vías, solo la actividad amilasa (Fig. 11) presentó diferencias significativas entre tratamientos por efecto de la fórmula ($p = 0.001$) siendo la formulación con algas la de mayor efecto en el incremento de la actividad, además de presentarse un efecto significativo de la interacción fórmula y predigestión ($p = 0.016$). La actividad amilasa fue significativamente mayor en el tratamiento Ab, en comparación con el control (C) y con los tratamientos Cb y Mb. Los tratamientos A y M presentaron valores intermedios, sin diferir significativamente de Ab ni de los demás tratamientos evaluados. Por el contrario, los valores más bajos de actividad amilasa se registraron en el tratamiento control. En el caso de las actividades de lipasa (Fig. 12) (fórmula $p = 0.973$, bacterias $p = 0.945$, interacción $p = 0.772$), quimotripsina

(Fig. 13) (fórmula $p = 0.895$, bacterias $p = 0.394$, interacción $p = 0.340$) y tripsina (Fig. 14) (fórmula $p = 0.812$, bacterias $p = 0.773$, interacción $p = 0.562$) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

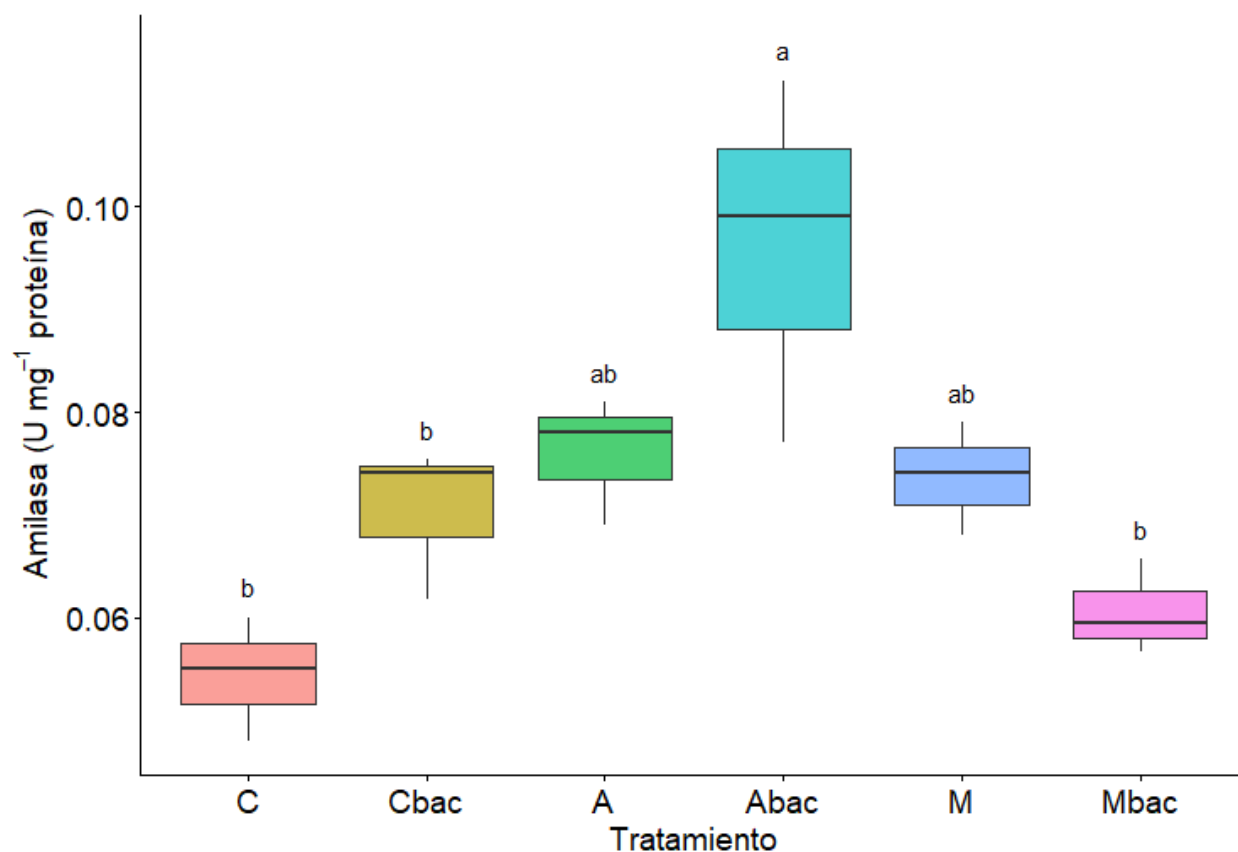


Figura 11. Actividad amilasa en el hepatopáncreas de camarones juveniles alimentados con diferentes tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron: C (alimento de referencia), Cb (alimento de referencia pre-digerido por *Bacillus safensis*), A (mix de algas), Ab (mix de algas pre-digerido por *Bacillus safensis*), M (mix de algas y harinas vegetales) y Mb (mix de algas y harinas vegetales pre-digerido por *Bacillus safensis*). Los valores se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA 2 vías seguido de prueba de Tukey considerando la interacción de la formulación con la predigestión con las bacterias, $p = 0.016$).

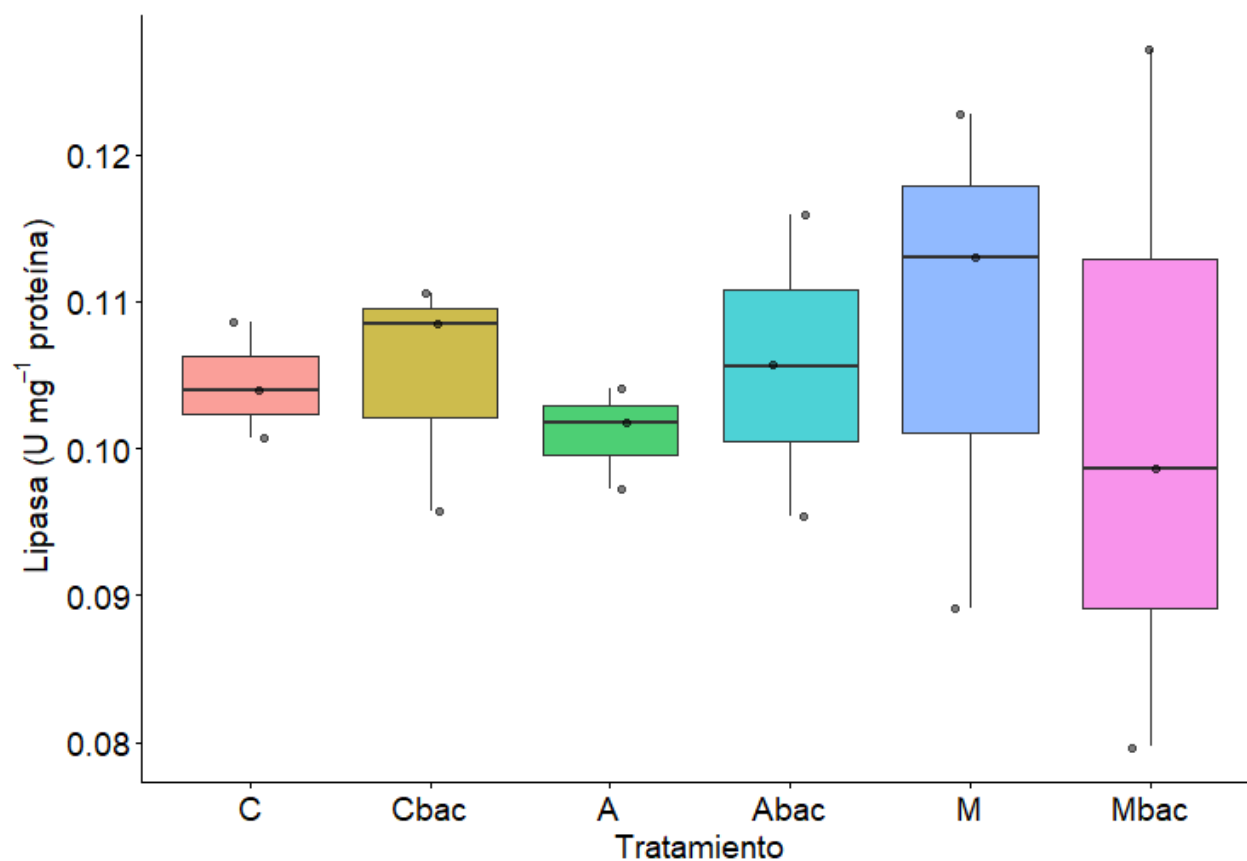


Figura 12. Actividad lipasa en el hepatopáncreas de camarones juveniles alimentados con diferentes tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron: C (alimento de referencia), Cb (alimento de referencia pre-digerido por *Bacillus safensis*), A (mix de algas), Ab (mix de algas pre-digerido por *Bacillus safensis*), M (mix de algas y harinas vegetales) y Mb (mix de algas y harinas vegetales pre-digerido por *Bacillus safensis*). Los valores se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA 2 vías $p > 0.05$).

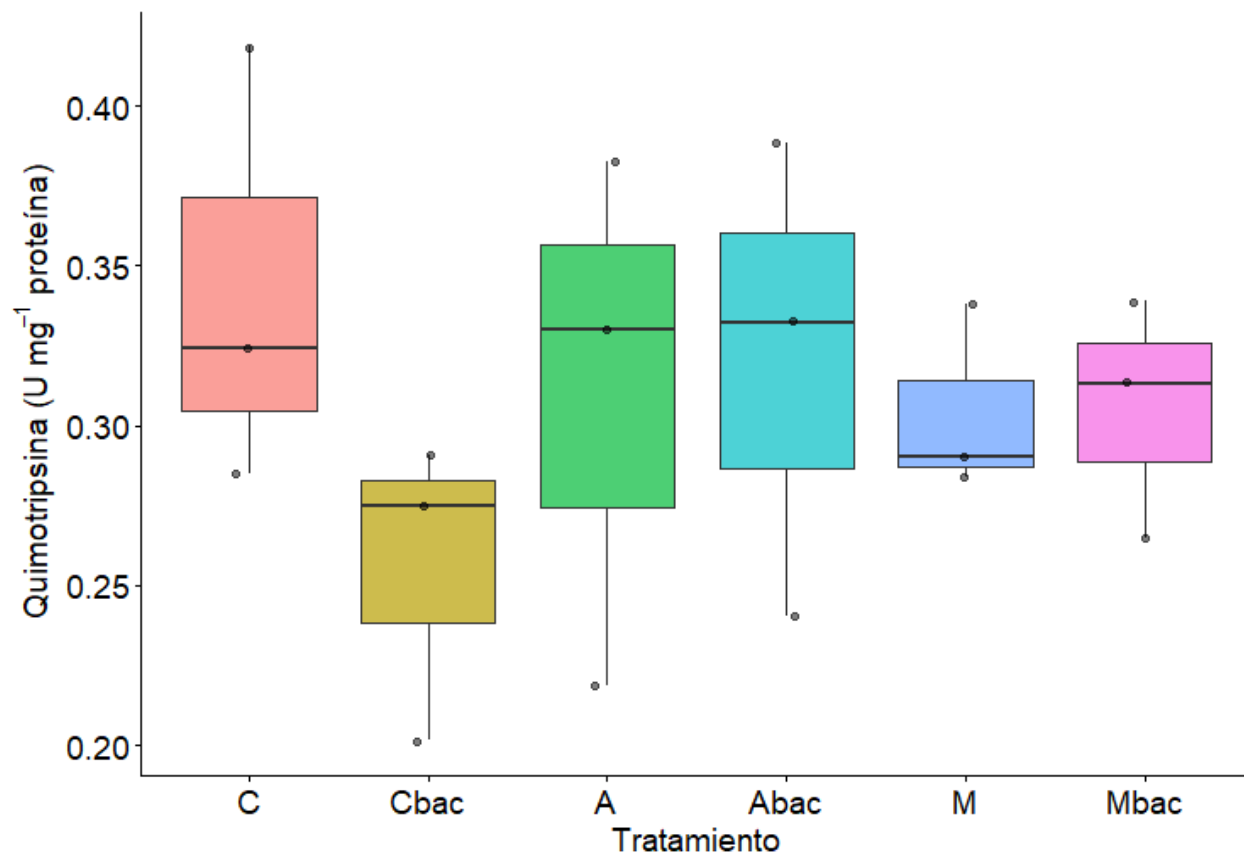


Figura 13. Actividad quimotripsina en el hepatopáncreas de camarones juveniles alimentados con diferentes tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron: C (alimento de referencia), Cb (alimento de referencia pre-digerido por *Bacillus safensis*), A (mix de algas), Ab (mix de algas pre-digerido por *Bacillus safensis*), M (mix de algas y harinas vegetales) y Mb (mix de algas y harinas vegetales pre-digerido por *Bacillus safensis*). Los valores se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA 2 vías $p > 0.05$).

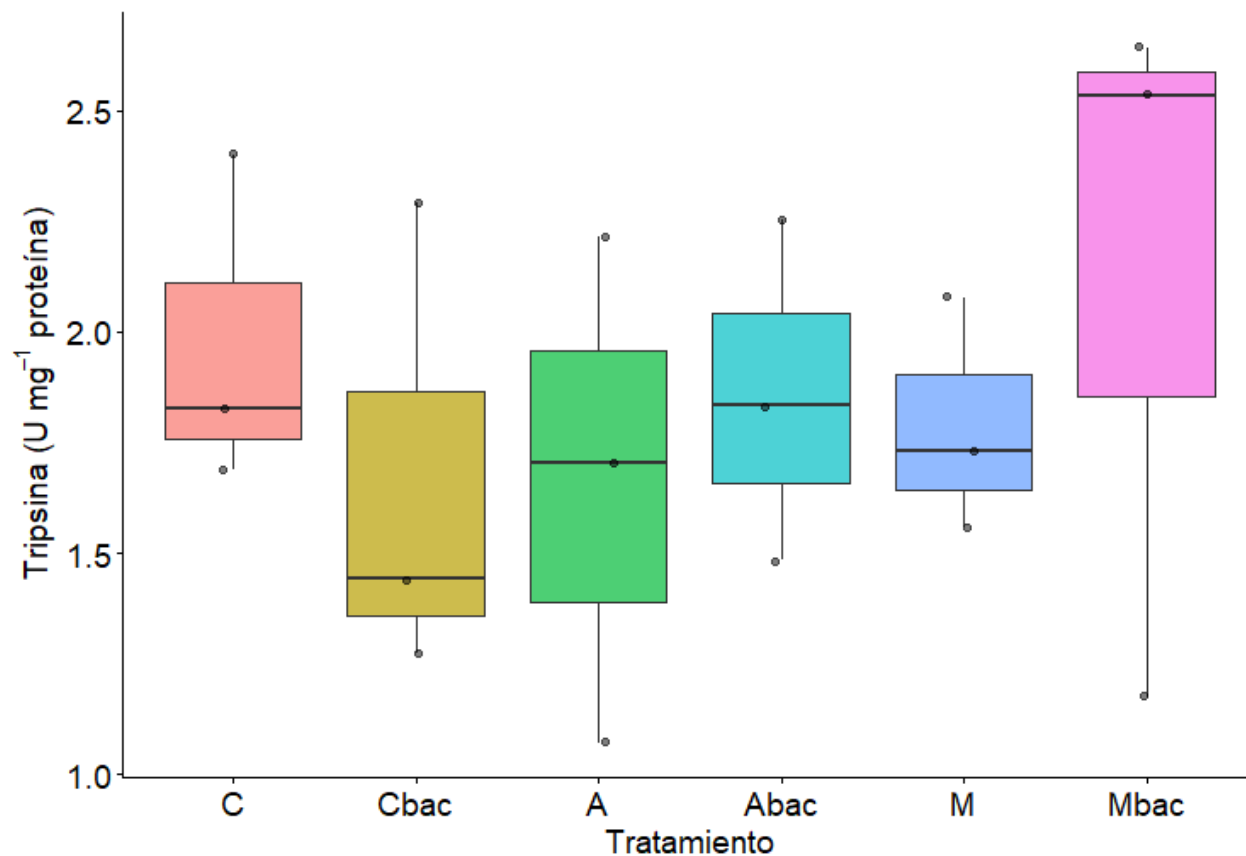


Figura 14. Actividad tripsina en el hepatopáncreas de camarones juveniles alimentados con diferentes tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron: C (alimento de referencia), Cb (alimento de referencia pre-digerido por *Bacillus safensis*), A (mix de algas), Ab (mix de algas pre-digerido por *Bacillus safensis*), M (mix de algas y harinas vegetales) y Mb (mix de algas y harinas vegetales pre-digerido por *Bacillus safensis*). Los valores se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Letras diferentes sobre las cajas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA 2 vías $p > 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Caracterización de actividad enzimática de *Bacillus safensis*

8.2 Pruebas bioquímicas y actividad enzimática

Las pruebas bioquímicas constituyen un método rápido y accesible para la identificación preliminar de bacterias, pues permiten inferir capacidades metabólicas clave asociadas con la presencia o ausencia de determinadas enzimas (Koneman, 1999). En este estudio, morfotipos BS1-A y BS1-B mostraron un perfil bioquímico consistente con su pertenencia al género *Bacillus*: fueron positivos para ornitina, fermentaron todas las fuentes de carbono evaluadas y presentaron crecimiento desde los 15 °C, rasgos que las distinguen claramente de *Bacillus subtilis*, cuyo rango psicrótrofo es más restringido. Estas características sugieren que *Bacillus safensis* posee una notable versatilidad metabólica y ecológica, comparable a la observada en *B. pumilus*, *B. altitudinis* y *B. amyloliquefaciens*, especies reconocidas por su capacidad para adaptarse a entornos variables, incluidos suelos agrícolas, ambientes marinos y sistemas de acuicultura (Hara *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2020). Esta convergencia de rasgos metabólicos reafirma la posición de *Bacillus safensis* dentro del grupo de bacilos ambientalmente resilientes.

Sin embargo, también se identificaron diferencias relevantes entre los dos morfotipos. El morfotipo BS1-A fue citrato positivo y toleró concentraciones de NaCl de hasta 8% y 10%, mientras que BS1-B mostró una tolerancia más reducida. Esta divergencia fenotípica dentro de una misma especie resulta particularmente interesante, ya que podría reflejar procesos de adaptación a microambientes específicos o diferencias en mecanismos fisiológicos relacionados con la respuesta al estrés osmótico. Estudios en especies del género *Bacillus* han documentado variabilidad significativa entre cepas de una misma especie en características fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la utilización de sustratos, actividades metabólicas y tolerancia a diferentes condiciones ambientales (Chang *et al.*, 2007; Candeli *et al.*, 1979). Estos antecedentes sugieren que la plasticidad metabólica constituye una característica frecuente y potencialmente ventajosa dentro del género.

Asimismo, investigaciones en *B. firmus* han mostrado que la capacidad metabólica y la adaptación a ambientes con alta salinidad pueden variar considerablemente entre cepas estrechamente relacionadas (Ashraf et al., 2021). En conjunto, estos estudios respaldan la idea de que las diferencias detectadas entre los morfotipos BS1-A y BS1-B se encuentran dentro del rango de variabilidad fenotípica esperado para el género *Bacillus*.

En cuanto a la producción de enzimas extracelulares, ambos morfotipos de *Bacillus safensis* fueron positivas para proteasas y celulasas, coincidiendo con lo reportado por Gamarra et al. (2020) en una cepa aislada de suelo en un cultivo de maíz (*Zea mays*). Este patrón coincide también con hallazgos en *B. pumilus*, *B. altitudinis* y *B. amyloliquefaciens*, conocidas por su capacidad para producir enzimas hidrolíticas de importancia biotecnológica (Coleman, 1967; Cutting, 2011). Esto sugiere que la secreción de proteasas y celulasas podría ser un rasgo conservado entre especies filogenéticamente cercanas como *B. pumilus* y *Bacillus safensis*, lo que facilitaría su supervivencia en ambientes ricos en materia orgánica compleja y reforzaría su potencial uso en aplicaciones industriales. La producción de enzimas microbianas continúa siendo un campo de importancia estratégica, especialmente en la industria de la alimentación animal, donde se emplean para mejorar la digestibilidad de ingredientes, reducir factores antinutricionales y optimizar el aprovechamiento de nutrientes. Las especies del género *Bacillus* destacan por su elevada tasa de crecimiento, su eficiencia fermentativa y su notable capacidad de secreción de proteínas extracelulares, incluyendo enzimas heterólogas. Adicionalmente, muchas especies de este género son consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Gupta et al., 2015), lo que impulsa su uso en la formulación de probióticos y aditivos enzimáticos.

8.3 Curva de crecimiento de *Bacillus safensis*

La caracterización cinética del crecimiento de los morfotipos BS1-A y BS1-B permitió delimitar las fases fisiológicas clave para la interpretación funcional y para la estandarización de ensayos enzimáticos. La curva de crecimiento obtenida (Figura 1) mostró diferencias discretas pero biológicamente relevantes entre los morfotipos, particularmente durante la fase de adaptación y en la densidad celular alcanzada en fase estacionaria. BS1-A presentó una fase lag más corta, lo

que indica una capacidad superior para activar de manera rápida los sistemas metabólicos necesarios para iniciar el crecimiento exponencial. Este comportamiento es congruente con la presencia del operón *nas* en BS1-A, cuya función en la asimilación de nitrato y la regulación del metabolismo nitrogenado, la cual ha sido bien documentada en *Bacillus subtilis* (Nakano *et al.*, 1998; Commichau *et al.*, 2006). La eficiencia en la reorganización metabólica bajo disponibilidad limitada de nitrógeno podría otorgar a BS1-A una ventaja fisiológica inicial sobre BS1-B, que carece de este operón, de acuerdo con nuestros análisis genómicos.

Durante la fase logarítmica ambas cepas exhibieron tasas de crecimiento comparables, lo que sugiere que los mecanismos centrales de división celular permanecen conservados a pesar de las diferencias genómicas detectadas previamente. No obstante, BS1-B alcanzó una biomasa máxima ligeramente mayor en la fase estacionaria. Este patrón podría asociarse con estrategias divergentes de regulación metabólica o con la presencia, únicamente en BS1-B, de un clúster tipo RiPP relacionado con factores de muerte durante la esporulación, los cuales pueden influir en la competencia intraespecífica y en la dinámica poblacional (Liu *et al.*, 2010; Egan *et al.*, 2020). El análisis de estas curvas resulta especialmente relevante al considerar la producción de enzimas extracelulares. Estudios clásicos y contemporáneos han mostrado que enzimas como amilasa, celulasa y proteasa se secretan principalmente durante la fase logarítmica, pero su síntesis puede mantenerse o incluso incrementarse durante la fase estacionaria, dependiendo de la disponibilidad de recursos y de señales de densidad celular (Coleman, 1967; Schallmey *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2015). Por lo tanto, la transición bien definida hacia la fase estacionaria en ambas cepas constituye un parámetro crítico para establecer los tiempos óptimos de cosecha e inducción en futuros ensayos.

8.4 Actividad antagónica de *Bacillus safensis*

Los morfotipos BS1-A y BS1-B, demostraron capacidad para inhibir a las cepas de *Vibrio* evaluadas (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio diabolicus* y *Vibrio harveyi*), lo cual es consistente con lo reportado por Huynh-Phuoc *et al.* (2022), quienes observaron que *Bacillus safensis* VQV1 y VQV8 inhibieron el crecimiento de cuatro especies de *Vibrio*. De manera similar, Silva *et al.* (2018) reportaron que *Bacillus safensis* SG-32 inhibió el desarrollo de 20 de 26 aislamientos bacterianos

(excluyendo *Vibrio*) provenientes de un reservorio petrolero. En conjunto, estos resultados evidencian la capacidad antagonista de *Bacillus safensis* frente a diversas especies del género *Vibrio* y respaldan su potencial uso en la prevención de enfermedades en sistemas acuáticos.

Estudios recientes han reconocido a *Bacillus safensis* como una especie de relevancia científica e industrial (Huynh-Phuoc *et al.*, 2022); sin embargo, hasta el momento y hasta donde se realizó la búsqueda bibliográfica, no existe reporte previo que documente su capacidad para inhibir bacterias patógenas del género *Vibrio* de importancia acuícola. En este contexto, los morfotipos evaluados en el presente estudio muestran un alto potencial como agentes inhibidores de bacterias patógenas del género *Vibrio* y, como se indicó en la sección de resultados, podrían incluso ejercer actividad antagonista frente a cepas de *V. diabolicus* resistentes a antibióticos.

8.5 Análisis bioinformático de las cepas

El genoma de BS1-A (3,686,099 pb; GC 41.76%) cae dentro del rango esperado para genomas del género *Bacillus* (tamaños ~3–5 Mb y GC típicamente ~35–47%, según la especie), lo que sugiere una arquitectura genómica “convencional” más que una reducción/extensión marcada. La ANI de 97.46% entre BS1-A y el genoma de referencia de *Bacillus safensis* (PgKB20) es particularmente importante porque rebasa el umbral comúnmente aceptado para definir pertenencia a la misma especie ≈95–96% ANI (Elbir, 2024). En conjunto, estos valores sostienen que BS1-A pertenece a *Bacillus safensis*, pero con divergencia intraespecífica suficiente para plantear diferencias genómicas relevantes (p. ej., islas genómicas, profagos, genes accesorios). En cuanto al segundo morfotipo BS1-B nuestro ANI de 99.999% con BS1-A, lo cual es compatible con que ambos sean prácticamente clónicos a nivel genómico (diferencias mínimas, típicamente pocas variantes puntuales o pequeñas indels). Los datos de secuenciación reportados para BS1-B (157,576 lecturas; cobertura ~98X) sugieren robustez para detectar variantes y ensamblar con confianza (aunque el rN50 de 3,651 pb apunta a lecturas relativamente cortas/fragmentación, lo que puede dificultar resolver regiones repetidas o elementos móviles completos).

Considerando la alta identidad genómica entre ambos morfotipos (ANI 99.999%), los análisis bioinformáticos subsecuentes se llevaron a cabo utilizando el genoma del morfotipo BS1-A como

representante. La identificación de genes característicos de fagos, como terminasa, proteínas estructurales y holinas, mediante dos herramientas independientes (PHASTEST y VirSorter) proporciona evidencia sólida de la presencia de un profago integrado en el genoma de BS1-A. PHASTEST permite la detección y visualización de regiones profágicas, mientras que VirSorter identifica señales virales en genomas microbianos, lo que refuerza la confiabilidad de este hallazgo (Wishart *et al.*, 2023). Este resultado se correlaciona con la presencia de genes únicos anotados como proteínas hipotéticas, ya que las regiones profágicas y las islas genómicas suelen concentrar ORFs de función aún no caracterizada. Asimismo, el análisis con antiSMASH reveló clústeres génicos asociados con la biosíntesis de lichenisina, plantazolicina y bacilisina, lo que sugiere un importante potencial para la producción de metabolitos secundarios implicados en interacciones competitivas, colonización y antagonismo microbiano. antiSMASH es actualmente una herramienta de referencia para la minería de clústeres biosintéticos en bacterias y hongos, y su aplicación respalda la inferencia del potencial metabólico de BS1-A (Blin *et al.*, 2019).

En cuanto al resistoma, la detección consistente del gen *cat86_1* por los programas RGI/CARD y ResFinder indica la presencia de una cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) asociada a resistencia a fenicoles. CARD/“RGI” y ResFinder son recursos ampliamente usados para inferir genes de resistencia a partir de secuencias genómicas (Jia *et al.*, 2016). En particular, el gen *cat-86* fue descrito en *Bacillus* como determinante de una acetiltransferasa que confiere resistencia a cloranfenicol (Laredo *et al.*, 1988). El hecho de que muestre 90–100% de identidad con homólogos en múltiples *Bacillus* en bases públicas sugiere que puede ser un determinante relativamente diseminado dentro del grupo, potencialmente mantenido por presión selectiva ambiental o co-selección (p. ej., en entornos con antibióticos/biocidas). CARD también cataloga variantes de *cat86* en *Bacillus* (p. ej., *B. pumilus*), lo que apoya su plausibilidad filogenética dentro del género. No obstante, la presencia del gen *cat86_1* asociado a resistencia a cloranfenicol debe considerarse con cautela al evaluar el potencial probiótico de la cepa, ya que los microorganismos destinados a aplicaciones acuícolas deben minimizar el riesgo de actuar como reservorios de genes de resistencia transferibles (Balcázar *et al.*, 2006; Cabello *et al.*, 2013). La transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias ambientales y patógenas representa una preocupación importante en sistemas acuícolas intensivos (Mathur y Singh, 2005). Sin embargo,

este gen ha sido reportado previamente en especies del género *Bacillus* y, cuando se encuentra integrado en el cromosoma, su probabilidad de transferencia puede ser menor (EFSA, 2012). Aun así, se requieren análisis adicionales para evaluar la movilidad genética de este determinante y confirmar la seguridad de la cepa para su uso como probiótico.

Finalmente, el análisis de pangenoma basado en 36 genomas y el árbol con genes núcleo por máxima verosimilitud es una aproximación estándar para evaluar estructura poblacional y parentesco. Roary se usa ampliamente para estimar pangenomas bacterianos (núcleo/accesorio) (Page *et al.*, 2015), y RAxML es un programa clásico para inferencia filogenética por máxima verosimilitud (Stamatakis., 2014). El hallazgo de un clúster accesorio compartido con FUA2117 implicado en remodelación de pared celular (p. ej., *lytB* y *lytC*) es biológicamente sugestivo: en *Bacillus subtilis*, *LytC* (amidasa) y su potenciador *LytB* participan en procesos de remodelación de pared que facilitan fenómenos dependientes de la envoltura celular (Baidya *et al.*, 2020). Este paralelismo funcional apoya la hipótesis de que este módulo podría contribuir a diferencias fenotípicas (incluido morfotipo), por efectos sobre pared celular, autólisis localizada, separación celular o interacción con superficies.

8.6 Efecto de las cepas en la supervivencia de *Artemia*

El uso de *Artemia* como bioindicador es ampliamente reconocido, ya que su sensibilidad permite detectar toxicidad aguda de compuestos químicos, extractos biológicos y microorganismos patógenos (Meyer *et al.*, 1982; Sorgeloos *et al.*, 1998; Gajardo y Beardmore, 2013). En este contexto, la ausencia de efectos tóxicos de *Bacillus safensis* BS1-A y BS1-B es un resultado relevante, particularmente porque *Bacillus* spp. se utilizan con frecuencia en aplicaciones biotecnológicas, en bioformulaciones agrícolas y en procesos de biorremediación debido a su carácter generalmente inocuo (GRAS) y su capacidad para interactuar con el ambiente sin efectos secundarios negativos (Satomi *et al.*, 2006; Cutting *et al.*, 2011; Logan y De Vos, 2015).

Además, estudios previos han señalado que *Bacillus safensis* es una especie adaptada a ambientes extremos, capaz de sobrevivir bajo condiciones de radiación, estrés osmótico y baja disponibilidad de nutrientes, sin que se le considere una especie patógena de importancia

conocida (Satomi *et al.*, 2006; Vaishampayan *et al.*, 2010). Esto coincide con los resultados del presente estudio, donde ninguna de las cepas probadas afectó negativamente la eclosión de un organismo ampliamente utilizado en toxicología. En el bioensayo realizado en el presente estudio con quistes de *Artemia* permitió determinar el posible efecto de las cepas *Bacillus safensis* BS1-A y BS1-B sobre la eclosión de nauplios durante las primeras 24 horas de incubación. En términos generales, los resultados obtenidos indican que no existe un impacto significativo sobre el proceso de eclosión en ninguna de las concentraciones evaluadas, lo que sugiere que ambas cepas carecen de toxicidad aguda en *Artemia* durante esta etapa temprana de desarrollo.

En el caso de la cepa BS1-A, las medias de eclosión oscilaron entre 9.33 ± 0.58 y 12.67 ± 3.06 organismos, valores que se encuentran dentro del rango observado para el control (12 ± 2.65). Aunque se detectaron ligeras disminuciones o incrementos en algunos tratamientos particularmente, una reducción moderada a 9.33 nauplios en 100 μL y un aumento a 12.67 nauplios en 1000 μL estas variaciones no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.40$). Tales fluctuaciones son comunes en bioensayos con *Artemia*, ya que factores como la calidad de los quistes, microvariaciones ambientales o incluso la dinámica osmótica durante la hidratación pueden generar diferencias en la eficiencia de eclosión aún bajo condiciones controladas (Vanhaecke y Sorgeloos, 1980; Abatzopoulos *et al.*, 2002).

Por otra parte, los resultados obtenidos para BS1-B mostraron un comportamiento similar. Si bien las medias de eclosión entre 14.33 ± 0.58 y 16.67 ± 4.04 nauplios fueron ligeramente superiores al control (12.67 ± 0.58), estas diferencias nuevamente no alcanzaron significancia estadística ($p = 0.34$). El incremento observado en el tratamiento de 100 μL podría interpretarse como una posible estimulación del proceso de eclosión; sin embargo, dada la inexistencia de significancia estadística y el solapamiento de las desviaciones estándar, es más plausible que dicho incremento refleje variabilidad experimental natural antes que un efecto biológico atribuible a BS1-B. Diversos estudios describen que, en ocasiones, la presencia de microorganismos no patógenos puede modificar microcondiciones como la oxigenación o la tensión superficial, pudiendo generar variaciones menores en la eclosión; no obstante, estas alteraciones rara vez resultan biológicamente relevantes (Bakkers *et al.*, 2021).

8.7 Efecto de la aplicación de *Bacillus safensis* en el agua de cultivo de camarón

Diversas especies del género *Bacillus* han sido ampliamente reconocidas como probióticos en acuicultura, debido a los beneficios que confieren a distintas especies acuáticas, incluyendo la promoción del crecimiento, el fortalecimiento del sistema inmune y una mayor resistencia a enfermedades, particularmente en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) (Nayak, 2021). En el presente estudio la aplicación de ambos morfotipos de *Bacillus safensis* en el agua de cultivo, contribuyó al crecimiento, ganancia en peso, consumo de alimento y supervivencia de los camarones en comparación con el tratamiento control (sin aplicación de bacterias) y de forma similar con el tratamiento COM (aplicación de probiótico comercial). Estos resultados coinciden con lo observado en otros estudios al aplicar en el agua de cultivo bacterias benéficas del género *Bacillus*. Por ejemplo, la aplicación en el agua de cultivo de una mezcla equimolar de dos cepas de *Bacillus subtilis*, a concentraciones de 10^5 y 10^8 UFC mL⁻¹, resultó en una mejora significativa en la tasa de crecimiento y en la conversión alimenticia del camarón en comparación con un tratamiento sin probióticos (Zokaeifar *et al.*, 2014). Estos efectos benéficos se han asociado, al menos en parte, con un aumento en la actividad de enzimas digestivas y con la modulación favorable de la microbiota intestinal (Zokaeifar *et al.*, 2014; Olmos *et al.*, 2020).

Hasta donde se tiene conocimiento, no existen reportes previos sobre el uso de *Bacillus safensis* como probiótico en el cultivo de *Penaeus vannamei*. Sin embargo, en estudios realizados con tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), la inclusión de *Bacillus safensis* (cepa NPUST1) en el alimento, a concentraciones de 10^5 a 10^7 UFC g⁻¹ durante ocho semanas, promovió un mejor crecimiento, estimuló la inmunidad innata y aumentó la resistencia frente a *Streptococcus iniae* (Wu *et al.*, 2021).

La aplicación de bacterias benéficas en el agua no siempre resulta en un aumento en el rendimiento productivo de los camarones en términos de crecimiento o eficiencia de utilización de alimento. Por ejemplo, en un estudio donde aplicaron en el agua de cultivo bacterias del género *Bacillus* (*Bacillus thuringiensis*, *B. licheniformis* y *B. cereus*) aisladas de flóculos de cultivo super intensivo de *Penaeus vannamei*, no observaron diferencias significativas en términos de crecimiento ($p < 0.05$) después de 42 días de cultivo (Ferreira *et al.*, 2015). Sin embargo, estos

autores indican que encontraron un efecto positivo en parámetros inmunológicos ya que aumentaron el recuento total de hemocitos y el contenido aglutinante en suero. De igual forma, los resultados para Llarío *et al.*, 2019, fueron similares al evaluar el efecto de *Bacillus amyloliquefaciens* en el proceso de maduración de un sistema de biofloc para *Penaeus vannamei* durante un periodo de 169 días, indicando un efecto positivo sobre el sistema inmunológico que se vio reflejado en el aumento de los hemocitos granulares, sin embargo, no hubo diferencias significativas en el crecimiento de los organismos, asociado a un aumento en los nitritos del agua de cultivo. Estos estudios sugieren que podría ser de interés realizar en futuras investigaciones, la evaluación de los parámetros inmunológicos en camarones donde se aplique *Bacillus safensis* como probiótico en el agua.

La diferencia entre los resultados encontrados en el presente trabajo de investigación en donde sí fue detectado un efecto positivo sobre el crecimiento de los camarones y otros trabajos previos donde no se observa este efecto, se puede deber a las propiedades bioquímicas previamente descritas en este estudio, como la actividad digestiva que permitirían un mejor aprovechamiento del alimento y una mejoría en la calidad de agua del cultivo, como se ha documentado previamente (Ferreira *et al.*, 2015; Llarío *et al.*, 2019). En este sentido, en el presente estudio, la aplicación de ambos morfotipos de *Bacillus safensis* redujo el nitrógeno amoniacal total en comparación con el tratamiento Control. Esta propiedad ha sido reportada previamente para *Bacillus safensis* aplicado en aguas residuales domésticas (Kim *et al.*, 2021). Asimismo, la capacidad de *Bacillus safensis* para fermentar diferentes fuentes de carbono podría estar asociada con los menores niveles de sólidos sedimentables totales observados en el tratamiento BAC en comparación con el Control. Diversas especies del género *Bacillus* han sido reportadas como promotoras de la desnitrificación del amonio y de la remoción de carbono orgánico en efluentes de cultivo de camarón, además de contribuir al control de patógenos (Boopathy *et al.*, 2015; Sampath *et al.*, 2025). En conjunto, estos resultados sugieren que *Bacillus safensis* podría desempeñar un papel dual en la mejora de la calidad del agua y en el mantenimiento de un ambiente microbiano más estable, lo que favorecería un mejor desempeño productivo y una mayor sostenibilidad del sistema de cultivo.

8.8 Efecto de la aplicación de *Bacillus safensis* en el alimento sobre el cultivo de camarón

Los resultados obtenidos durante el bioensayo no muestran diferencias significativas en los parámetros zootécnicos evaluados entre los tratamientos que incluyen la adición directa de bacterias al alimento y los tratamientos sin bacteria. En el presente experimento es importante remarcar que la formulación de los alimentos experimentales considero hasta 28.4% de inclusión de ingredientes alternativos, en específico de macroalgas, sin presentar diferencias significativas en el crecimiento de los camarones respecto al alimento control.

La utilización de harinas de macroalgas mostró ser igual de eficiente en términos de rendimiento de crecimiento que el uso de harinas vegetales convencionales como la harina de trigo, lo que resalta el potencial de estas fuentes, en particular de las harinas de macroalgas, como ingredientes viables para la formulación de dietas en acuicultura. Los niveles de inclusión de macroalgas en las dietas fueron de 28.4% y 14.2%, respectivamente. Sin embargo, al considerar el nivel de inclusión individual de cada harina de alga, el aporte máximo no superó el 7%, lo cual se encuentra dentro de los rangos recomendados por diversos autores para evitar efectos negativos sobre el crecimiento del camarón asociados con una inclusión excesiva de macroalgas (Cruz-Suárez *et al.*, 2009; Rodríguez-González *et al.*, 2014).

Por lo tanto, el uso combinado de diferentes harinas de algas podría diversificar la estructura de fibras y polisacáridos, permitiendo niveles de inclusión seguros sin comprometer la capacidad digestiva ni la utilización de nutrientes. Estudios previos han demostrado que la combinación de algas en dietas para camarón puede generar efectos fisiológicos benéficos; por ejemplo, la inclusión de *Sargassum* y *Undaria* en proporciones de 1%:2% y 1%:4% incrementó la diversidad bacteriana intestinal y redujo la mortalidad acumulada tras un desafío con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) bajo condiciones de fluctuación térmica (Rezende *et al.*, 2022).

Este hallazgo es consistente con investigaciones previas, como la realizada por Bae *et al* (2020), quienes llevaron a cabo un estudio para evaluar diversas dietas en términos de su aceptación por los organismos y su impacto en parámetros de desempeño, tales como el aumento de peso, la tasa de crecimiento específico, la eficiencia alimentaria y la eficiencia proteica. En dicho estudio,

todas las dietas fueron aceptadas sin inconvenientes, logrando un alto porcentaje de supervivencia en los organismos evaluados, resultado que también se reflejó en este trabajo. Respecto a la aplicación de *Bacillus safensis* en el alimento, no se observaron diferencias significativas en los parámetros zootécnicos evaluados entre los tratamientos. Otros trabajos donde se adiciona bacterias probióticas en el alimento si han resultado en un efecto positivo en el rendimiento productivo de los camarones. Por ejemplo, la suplementación de dietas conteniendo 79% ingredientes vegetales y aproximadamente 1.2×10^4 UFC g⁻¹ de *Bacillus subtilis* ha demostraron efectos positivos sobre el crecimiento y la eficiencia alimenticia de *Penaeus vannamei* respecto a dietas control (Olmos *et al.*, 2011). Este efecto se lo atribuyen a la gran capacidad de *Bacillus subtilis* para degradar los carbohidratos de sustratos vegetales que permitió fungir como fuente de energía para los camarones (Olmos *et al.*, 2011).

En este sentido, parece que *Bacillus safensis* no es eficiente para la degradación de las paredes celulares de los ingredientes vegetales que permitan una mejor utilización y aprovechamiento del alimento. Por otro lado, es posible que en camarones mas grandes a los utilizados en este estudio, pudieran presentar mejor aprovechamiento de las fuentes vegetales, ya que se ha visto que después de 6 g, su actividad amilasa se incrementa (Gamboa-Delgado *et al.*, 2003).

El uso de probióticos como *Bacillus subtilis* ha sido ampliamente estudiado debido a su potencial para mejorar el rendimiento del crecimiento, optimizar la digestibilidad de los nutrientes y fortalecer la respuesta inmune de los organismos. Sin embargo, en este estudio específico con la evaluación de los dos morfotipos de *Bacillus safensis* no se observaron diferencias significativas en los resultados de crecimiento al comparar las dietas con y sin la adición de bacterias. En este caso, los resultados obtenidos destacan la necesidad de continuar explorando el uso de ingredientes alternativos y complementarios, tanto para reducir la dependencia de recursos marinos como para garantizar una alimentación equilibrada y eficiente en términos de costos y producción.

8.9 Efecto de la pre-digestión del alimento con *Bacillus safensis* sobre el cultivo de camarón

En el presente estudio, la predigestión del alimento con *Bacillus safensis* no produjo efectos estadísticamente significativos sobre los parámetros zotécnicos evaluados en *Penaeus vannamei*, incluyendo la tasa de crecimiento, tasa de crecimiento específico, consumo de alimento, supervivencia, peso final, ganancia en peso y factor de conversión alimenticia. Estos resultados indican que la predigestión del alimento no mejoró el desempeño productivo bajo las condiciones experimentales evaluadas. Resultados similares han sido reportados en estudios donde la inclusión de bacterias del género *Bacillus* no produjo mejoras significativas en el crecimiento cuando las dietas presentaban una adecuada calidad nutricional (Wang, 2007). Por otro lado, en el camarón tigre *Penaeus monodon*, la pre-digestión de alimento por fermentación con un *Bacillus sp.* aislado del tracto digestivo del pez *Lates calcarifer*, sí mejoró el crecimiento, la digestibilidad, la eficiencia de utilización de alimento, supervivencia y respuesta inmune (De et al., 2018). Este último puede ser debido a que *P. monodon* es una especie más carnívora que *Penaeus vannamei*, por lo que pudiera ser más evidente el efecto positivo de la pre-digestión de las fuentes vegetales para un mejor aprovechamiento de los nutrientes en la dieta. En otro estudio, la fermentación de harina de soya en reemplazo a harina de pescado en *Penaeus vannamei*, mejoró el crecimiento sin afectar su microbiota digestiva (Shiu et al., 2015). Esto sugiere que la fermentación/pre-digestión puede ser más beneficiosa sólo si se hace sobre los ingredientes vegetales y no sobre toda la mezcla de ingredientes del alimento.

A pesar de la ausencia de diferencias significativas, algunos tratamientos con alimento pre-digerido, como Ab y Mb, presentaron ligeramente mayores valores de crecimiento y peso final, mientras que Cb y Ab mostraron menores valores de FCA, lo que sugiere una tendencia hacia una mejor utilización del alimento. Este comportamiento puede atribuirse a la capacidad de bacterias del género *Bacillus* de producir enzimas extracelulares como proteasas y amilasas, las cuales pueden mejorar la disponibilidad de nutrientes mediante la degradación de compuestos complejos (Balcázar et al., 2006; Kuebutornye et al., 2019). Sin embargo, la falta de un efecto significativo podría explicarse por la alta digestibilidad de las dietas utilizadas y la eficiencia del sistema digestivo de *Penaeus vannamei*, el cual posee una elevada capacidad enzimática para digerir proteínas, carbohidratos y lípidos (Lemos et al., 2000). En este contexto, el beneficio de la

pre-digestión bacteriana puede ser más evidente cuando se utilizan dietas con mayor contenido de ingredientes vegetales de menor digestibilidad (Lin *et al.*, 2022; Cheng *et al.*, 2020).

Por otra parte, en el presente estudio, la supervivencia fue alta en todos los tratamientos, lo que indica que la predigestión con *Bacillus safensis* no tuvo efectos adversos sobre los organismos, lo cual coincide con estudios que reportan que bacterias del género *Bacillus* son seguras y ampliamente utilizadas en acuicultura (Nayak, 2010).

En conjunto, estos resultados sugieren que la pre-digestión del alimento con *Bacillus safensis* no mejora significativamente el crecimiento ni la eficiencia alimenticia de *Penaeus vannamei* bajo las condiciones evaluadas, aunque tampoco afecta negativamente su desempeño productivo, lo que indica que su efecto podría depender de factores como la composición del alimento, la cepa bacteriana y las condiciones de fermentación.

En el caso de la actividad enzimática digestiva de los camarones alimentados con los diferentes alimentos experimentales incluyendo los pre-digeridos, se observó un efecto significativo de la formulación sobre la actividad amilasa, siendo la inclusión de la mezcla de macroalgas en sustitución de la harina de trigo y sorgo, la que tuvo un efecto en el incremento de la actividad de esta enzima. También se observó un efecto de la interacción de la formulación y la aplicación de las bacterias para la predigestión sobre la actividad amilasa, siendo el alimento con la mezcla de macroalgas sin trigo y sorgo la de mayor actividad.

Estudios previos han demostrado que la inclusión de macroalgas en la dieta puede estimular la actividad digestiva en el hepatopáncreas del camarón. En particular, niveles dietarios de 2.5% y 5% de *Sargassum* incrementaron significativamente la actividad de enzimas digestivas, incluida la amilasa, en comparación con una dieta de referencia sin inclusión de algas (Melchor-Martínez *et al.*, 2023). Asimismo, se han reportado mejoras en la superficie epitelial intestinal de camarones alimentados con *Sargassum*, lo que sugiere una mayor capacidad de absorción de nutrientes (Schleder *et al.*, 2018).

De manera similar, el uso de *Eisenia sp.* y *Ulva lactuca* pre-digeridas, incluidas al 10% y 20% como sustitutos parciales de la harina de pescado y la harina de trigo en dietas para *Penaeus vannamei*, mostró un aumento significativo en la actividad de amilasa en comparación con la dieta control (Omont *et al.*, 2021). Estos resultados sugieren que los carbohidratos derivados de macroalgas presentan una mayor digestibilidad en comparación con aquellos provenientes de plantas terrestres.

Los camarones podrían exhibir una mayor capacidad para utilizar carbohidratos de origen algal que los provenientes de cereales terrestres, como el trigo, lo cual podría estar relacionado con diferencias en la estructura y complejidad de los polisacáridos (Wu *et al.*, 2014). Por otro lado, polisacáridos sulfatados presentes en las macroalgas pardas, como alginato, laminarina y fucoidano, han sido asociados con mejoras en la función digestiva y la salud intestinal (Bakky *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2022), favoreciendo así una utilización más eficiente de los carbohidratos en comparación con los carbohidratos predominantemente amiláceos del trigo o el sorgo. En conjunto, estos hallazgos resaltan la importancia de comprender las interacciones entre los polisacáridos de macroalgas y otros componentes dietarios, lo cual resulta clave para optimizar su inclusión en formulaciones prácticas para la alimentación del camarón.

Es importante destacar que el desarrollo de alternativas sostenibles en la alimentación para especies marinas es una prioridad en la industria de la acuicultura, tanto por razones económicas como ambientales. La utilización de ingredientes alternativos incluyendo ingredientes como las macroalgas, además de la investigación sobre procesos de valorización de estos, como la fermentación, representa un campo de estudio con un gran potencial. La búsqueda de dietas sostenibles no solo implica garantizar el crecimiento y la salud de las especies marinas, sino también minimizar el impacto ambiental asociado con la producción de alimentos en la acuicultura. Este enfoque es especialmente relevante para especies de alto valor comercial como *Penaeus vannamei*, cuya producción es clave para satisfacer la creciente demanda mundial de productos del mar.

9. CONCLUSIONES

1. Los morfotipos BS1-A y BS1-B de *Bacillus safensis* mostraron versatilidad metabólica, producción de enzimas extracelulares y actividad antagonista frente a especies del género *Vibrio*, evidenciando su potencial como agente de biocontrol en sistemas acuícolas.
2. Los bioensayos tanto en *Artemia* como en camarón demostraron que ambos morfotipos no presentan efectos tóxicos. Además, su aplicación en el agua de cultivo se asoció con mejoras en el desempeño productivo del camarón y con la disminución de compuestos nitrogenados, particularmente amonio. Estos efectos podrían estar relacionados con la capacidad metabólica de los morfotipos para fermentar diversas fuentes de carbono y participar en la transformación de materia orgánica, lo que favorecería la reducción de sólidos sedimentables y la remoción de carbono orgánico en el sistema. En conjunto, estos resultados sugieren que el principal mecanismo de acción de *Bacillus safensis* estaría asociado a la mejora de la calidad del agua de cultivo.
3. En contraste, la inclusión directa de las bacterias en el alimento y la predigestión bacteriana no generaron mejoras significativas en el crecimiento, lo que indica que su efecto benéfico pudiera depender del modo de aplicación y de la composición de la dieta.
4. Finalmente, la inclusión de macroalgas como ingredientes alternativos en las dietas no afectó el crecimiento de los camarones y favoreció la actividad digestiva, lo que respalda su potencial como componente sostenible en la formulación de alimentos acuícolas. En conjunto, los resultados destacan a *Bacillus safensis* y a las macroalgas como herramientas prometedoras para el desarrollo de estrategias más sostenibles en la acuicultura del camarón.

10. LITERATURA CITADA

- Abarike, E. D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., Tang, J. y Kuebutornye, F. K. A. (2018). Effects of a commercial probiotic containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, *82*, 229–238. doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.037.
- Abatzopoulos, T. J., Beardmore, J. A., Clegg, J. S. y Sorgeloos, P. (2002). *Artemia: Basic and Applied Biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. doi: 10.1007/978-94-017-0791-6
- Abdelsamad, A. E., Said, R. E., Assas, M., Gaafar, A. Y., Hamouda, A. H. y Mahdy, A. (2024). Effects of dietary supplementation with *Bacillus velezensis* on the growth performance, body composition, antioxidant, immune-related gene expression, and histology of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *BMC Veterinary Research*, *20*(1), 368. doi: 10.1186/s12917-024-04207-4
- Achi, O. K. y Nijoku-Obi, A. N. U. (1992). Production of a raw starch saccharifying amylase by *Bacillus alvei* grown on different agricultural substrates. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, *8*(2), 206-207. doi: 10.1007/BF01195849.
- Adilah, R. N., Chiu, S. T., Hu, S. Y., Ballantyne, R., Happy, N., Cheng, A. C. y Liu, C. H. (2022). Improvement in the probiotic efficacy of *Bacillus subtilis* E20-stimulates growth and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via encapsulation in alginate and coated with chitosan. *Fish and Shellfish immunology*, *125*, 74-83. doi: 10.1016/j.fsi.2022.05.002
- Alcock, B.P., Huynh, W., Chalil, R., et al. (2022). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, *51*, 690–699. doi: 10.1093/nar/gkac920.
- Amin, M. K., Lahay, A. F., Putriani, R. B., Reza, M., Putri, S. M. E., Sumon, M. A. A. y Santanumurti, M. B. (2023). The role of probiotics in vannamei shrimp aquaculture performance—A review. *Veterinary World*, *16*(3), 638. doi: 10.14202/vetworld.2023.638-649
- Anderson, J.L., Asche, F., Garlock, T. y Chu, J. (2017). Aquaculture: its role in the future of food. En: *World Agricultural Resources and Food Security*. doi: 10.1108/S1574-871520170000017011.
- AOAC (2005) *Official Methods of Analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, V.A.
- Arulmoorthy, M. P., Anandajothi, E., Vasudevan, S. y Suresh, E. (2020). Major viral diseases in culturable penaeid shrimps: a review. *Aquaculture International*, *28*(5), 1939-1967. doi:10.1007/s10499-020-00568-3
- Ashraf, S., Shah, A. y Ali, I. (2021). Physiological and biochemical diversity among *Bacillus firmus* strains isolated from saline environments. *Journal of Basic Microbiology*, *61*(3), 226–237. doi:10.15666/aeer/1602_12431256
- Ayisi, C. L., Hua, X., Apraku, A., Afriyie, G. y Kyei, B. A. (2017). Recent studies toward the development of practical diets for shrimp and their nutritional requirements. *HAYATI Journal of Biosciences*, *24*(3), 109-117. doi:10.4308/hjb.24.3.109
- Azeem, M. A., Shah, F. H., Ullah, A., Ali, K., Jones, D. A., Khan, M. E. H. y Ashraf, A. (2022). Biochemical characterization of halotolerant *Bacillus safensis* PM22 and its potential to enhance growth of maize under salinity stress. *Plants*, *11*(13), 1721. doi:10.3390/plants11131721

- Bae, J., Hamidoghli, A., Djaballah, M. S., Maamri, S., Hamdi, A., Souffi, I. y Bai, S. C. (2020). Effects of three different dietary plant protein sources as fishmeal replacers in juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 23(1), 1-6. doi:10.1186/s41240-020-0148-x
- Baidya, A.K., Bhattacharya, S., Dubey, G.P. y Ben-Yehuda, S. (2020). Donor-delivered cell wall hydrolases facilitate nanotube-mediated bacterial communication. *Nature Communications*, 11, 1938. doi: 10.1038/s41467-020-15605-1.
- Bakkers, S., Bosch, D. y Wiegertjes, G. (2021). Invertebrate models in toxicology and microbiology research. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1496–1512. doi:10.3390/ijms23126843
- Bakky, M.A.H., Tran, N.T., Zhang, Y. y Li, S. (2022). Utilization of marine macroalgae-derived sulphated polysaccharides as dynamic nutraceutical components in the feed of aquatic animals: a review. *Aquaculture Research*, 53, 5787–5808. doi: 10.1111/are.16078.
- Balcázar, J.L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D. y Múzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 173–186. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009.
- Berrada I., Benkhemmar O., Swings J., Bendaou N. y Amar M. 2012. Selection of halophilic bacteria for biological control of tomato gray mould caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 625–630.
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., et al. (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualization. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W46-W50. doi:10.1093/nar/gkad344
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Lee, S.Y., Medema, M.H. y Weber, T. (2019). antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W81–W87. doi: 10.1093/nar/gkz310.
- Boopathy, R., Kern, C. y Corbin, A. (2015). Use of *Bacillus* consortium in waste digestion and pathogen control in shrimp aquaculture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 159-164. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.02.001
- Bortolaia, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., et al. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345.
- Boyd, C.E., McNevin, A.A., Davis, R.P., Godumala, R. y Mohan, A.B.C. (2018). Production methods and resource use at *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* farms in India compared with previous findings from Thailand and Vietnam. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(3), 551–569. doi: 10.1111/jwas.12524.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H. y Dölz, H. J. (2016). Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), e127-e133. doi:10.1016/s1473-3099(16)00100-6
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A. y Buschmann, A.H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917-1942. doi: 10.1111/1462-2920.12134.

- Campa-Córdova, A. I., Yenni-Morales, C., Guzmán-Murillo, M. A. y Aguirre-Guzman, G. (2020). Evaluación de la respuesta productiva e inmune en juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei* alimentado con mezclas probióticas. *Revista de biología marina y oceanografía*, 55(1), 73-78. doi: 10.22370/rbmo.2020.55.1.2394
- Candeli, A., De Bartolomeo, A., Mastrandrea, V. y Trotta, F. (1979). Contribution to the Characterization of *Bacillus megaterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29(1), 25–31. doi: 10.1099/00207713-29-1-25
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M. y Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972–1973. doi: 10.1093/bioinformatics/btp348.
- Cárdenas, J.V., Gálvez, A.O., Brito, L.O., Galarza, E.V., Pitta, D.C. y Rubin, V.V. (2015). Assessment of different levels of green and brown seaweed meal in experimental diets for whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in recirculating aquaculture system. *Aquaculture International*, 23, 1491–1504. doi: 10.1007/s10499-015-9899-2.
- Chang, M., Lin, C. y Chen, T. (2007). Phenotypic variation in carbohydrate utilization and salt tolerance among strains of *Bacillus pumilus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 23, 543–550. doi:10.1016/j.micres.2020.126616
- Chebotar, V. K., Zaplatkin, A. N., Chizhevskaya, E. P., Gancheva, M. S., Voshol, G. P., Malfanova, N. V. y Pishchik, V. N. (2023). Phytohormone production by the endophyte *Bacillus safensis* ts3 increases plant yield and alleviates salt stress. *Plants*, 13(1), 75. doi:10.3390/plants13010075
- Chen, G., Liu, B., Chen, J., Liu, H., Tan, B., Dong, X., Yang, Q., Chi, S., Zhang, S. y Yao, M. (2022). Supplementing sulfate-based alginate polysaccharide improves Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed fishmeal replacement with cottonseed protein concentrate: effects on growth, intestinal health, and disease resistance. *Aquaculture Nutrition*, 2022: 7132362. doi: 10.1155/2022/7132362.
- Cheng, A. C., Ballantyne, R., Chiu, S. T. y Liu, C. H. (2023). Microencapsulation of *Bacillus subtilis* E20 probiotic, a promising approach for the enrichment of intestinal microbiome in white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fishes*, 8(5), 264. doi:10.3390/fishes8050264
- Cheng, A. C., Yeh, S. P., Hu, S. Y., Lin, H. L. y Liu, C. H. (2020). Intestinal microbiota of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets containing *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal (FSBM) or an antimicrobial peptide derived from *Bacillus subtilis* E20-FSBM. *Aquaculture Research*, 51(1), 41-50. doi:10.1111/are.14345
- Clausen, P.T.L.C., Aarestrup, F.M. y Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, 19, 307. doi: 10.1186/s12859-018-2336-6.
- Coleman, G. (1967). The extracellular enzymes of *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology*, 49(3), 421–431. doi: 10.1099/00221287-49-3-421
- Commichau, F. M., Forchhammer, K. y Stülke, J. (2006). Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 167–172. doi:10.1016/j.mib.2006.01.001
- Corral-Rosales, C., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E., Arjona, O. y Palacios, E. (2019). Fatty acids, sterols, phenolic compounds, and carotenoid changes in response to dietary inclusion of *Ulva*

- clathrata* in shrimp *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Journal of Applied Phycology*, 31, 4009–4020. doi: 10.1007/s10811-019-01829-2.
- Cruz Suárez, L. E., Tapia Salazar, M., Nieto López, M. G. y Ricque Marie, D. (2008). A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. En L. E. Cruz Suárez, D. Ricque Marie, M. Tapia Salazar y M. G. Nieto López (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola IX. Memorias del IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola* (pp. 304–333). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Guajardo-Barbosa, C. y Ricque-Marie, D. (2009). Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquaculture Nutrition*, 15: 421–430. doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00607.x.
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.007.
- Davis, D. A. (2005). Nutrient requirements of penaeid shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, 8(4), 72-74.
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. y Whitman, W.B. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3: The Firmicutes. *Springer*. doi del libro: 10.1007/978-0-387-68489-5
- De, D., Ananda Raja, R., Ghoshal, T. K., Mukherjee, S., y Vijayan, K. K. (2018). Evaluation of growth, feed utilization efficiency and immune parameters in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) fed diets supplemented with or diet fermented with gut bacterium *Bacillus sp.* DDKRC1. isolated from gut of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture research*, 49(6), 2147-2155. doi: 10.1111/are.13669
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current opinion in microbiology*, 14(3), 251-258. doi:10.1016/j.mib.2011.03.004
- Díaz, R., Gamazo, C. y López-Goñi, I. (1995); Manual práctico de Microbiología; Barcelona, España Editorial MASSON, S.A.
- Duarte, C.M., Bruhn, A. y Krause-Jensen, D. (2022). A seaweed aquaculture imperative to meet global sustainability targets. *Nature Sustainability*, 5: 185–193. doi: 10.1038/s41893-021-00773-9.
- Ederer, G. M. y Clark, M. (1970). *Motility-Indole-Ornithine Medium*. *Applied Microbiology*, 20(5), 849–850. doi: 10.1128/am.20.5.849-850.1970.
- EFSA (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6), 2740. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2740.
- Egan, L. A., Reizer, J. y Saier, M. H. (2020). Killing factors and cannibalism in *Bacillus* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3), e00025-20. doi: 10.1128/MMBR.00025-20
- El-Haroun, E.R., A-S-Goda, A.M. y Kabir-Chowdhury, M.A. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(1), 1473-1480. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01584.x
- El-Saadony, M. T., Swelum, A. A., Ghanima, M. M. A., Shukry, M., Omar, A. A., Taha, A. E. y Abd El-Hack, M. E. (2022). Shrimp production, the most important diseases that threaten it, and

- the role of probiotics in confronting these diseases: A review. *Research in veterinary science*, 144, 126-140. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.01.009
- Elbir, H. (2024). Updating the relationship between the threshold value of average nucleotide identity and digital DNA–DNA hybridization for reliable taxonomy of *Corynebacterium*. *Veterinary Sciences*, 11(12), 661. doi: 10.3390/vetsci11120661.
- Elizondo-González, R., Quiroz-Guzmán, E., Escobedo-Fregoso, C., Magallón-Servín, P. y Peña-Rodríguez, A. (2018). Use of seaweed *Ulva lactuca* for water bioremediation and as feed additive for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ*, 6: e4459. doi: 10.7717/peerj.4459.
- Emerenciano, M. G., Rombenso, A. N., Vieira, F. D. N., Martins, M. A., Coman, G. J., Truong, H. H. y Simon, C. J. (2022). Intensification of penaeid shrimp culture: an applied review of advances in production systems, nutrition and breeding. *Animals*, 12(3), 236. doi:10.3390/ani12030236
- Fan, X., Zhang, Y., Lin, S., *et al.* (2020). Ecophysiological characterization of *Bacillus altitudinis* strains from marine and soil habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1125–1137.
- FAO (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. FAO, Rome.
- FAO. (2024). The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: Blue Transformation in Action. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://doi.org/10.4060/cc9938en5>
- FAO/WHO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 1–4 October 2001. FAO, Rome. Disponible en: <https://www.fao.org/4/y6398e/y6398e.pdf>
- Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D.H., Prasad, A.B., Slotta, D.J., Tolstoy, I., Tyson, G.H., Zhao, S., Hsu, C.H., McDermott, P.F., Tadesse, D.A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J.P. y Klimke, W. (2021). Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11), e00483-19. doi: 10.1128/AAC.00483-19.
- Felix, N. y Brindo, R.A. (2014). Evaluation of raw and fermented seaweed, *Ulva lactuca* as feed ingredient in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 1(3), 199-204.
- Ferreira, G. S., Bolivar, N. C., Pereira, S. A., Guertler, C., do Nascimento Vieira, F., Mouriño, J. L. P. y Seiffert, W. Q. (2015). Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 448, 273-279. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.06.006
- Flores-Leyva, L. (2006). Evaluación de pigmentos carotenoides como aditivos alimentarios para la prevención de infecciones producidas por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi* en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría, CIBNOR. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/132>
- Flores-Miranda, M. C., Luna-González, A., Cortés-Espinosa, D. V., Álvarez-Ruiz, P., Cortés-Jacinto, E., Valdez-González, F. J. y González-Ocampo, H. A. (2015). Effects of diets with fermented duckweed (*Lemna sp.*) on growth performance and gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 23(2), 547-561.

- Fóes, G., Krummenauer, D., Lara, G., Poersch, L. y Wasielesky Jr, W. (2016). Long term storage and the compensatory growth of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in aquaculture ponds. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(3), 588-594. doi:10.3856/vol44-issue3-fulltext-17
- Froehlich, H.E., Runge, C.A., Gentry, R.R., Gaines, S.D. y Halpern, B.S. (2018). Comparative terrestrial feed and land use of an aquaculture-dominant world. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 5295–5300. doi: 10.1073/pnas.1801692115.
- Gajardo, G. y Beardmore, J. A. (2013). The Artemia model: developmental and evolutionary insights. *International Review of Hydrobiology*, 98(1), 1–18.
- Galicia-Nicolas, E.C., Águilar-Ramírez, R.N., Rico-Virgen, Medina-López, M. A. (2018). Colonización y sucesión de organismos marinos implicados en el proceso de biofouling en paneles sumergidos en La Paz, Baja California Sur, México. In: Estudios recientes en el océano Pacífico mexicano, P.M.A. & A.G.M.C. (Eds). Universidad de Colima, México, pp. 25-42.
- Gamarra, J., Pérez, D. y Ríos, C. (2020). Caracterización de *Bacillus safensis* aislado de suelo agrícola y evaluación de su potencial enzimático. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 45–57.
- Gamboa-delgado, J., Molina-poveda, C. y Cahu, C. (2003). Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture research*, 34(15), 1403-1411. doi:10.1111/j.1365-2109.2003.00959.x
- García-Poza, S., Pacheco, D., Cotas, J., Marques, J.C., Pereira, L. y Gonçalves, A.M. (2022). Marine macroalgae as a feasible and complete resource to address and promote Sustainable Development Goals (SDGs). *Integrated Environmental Assessment and Management*, 18, 1148–1161. doi: 10.1002/ieam.4598.
- Godínez-Siordia, D. E., Chávez-Sánchez, M. C. y Gómez-Jiménez, S. (2011). Acuicultura epicontinental del camarón blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(1), 55-62.
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185–189.
- Grant, J.R., Enns, E., Marinier, E., et al. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W484–W492. doi: 10.1093/nar/gkad326.
- Gruber, C., Bui-Chau-Truc, D., Kesselring, J. C., Nguyen, N. D., Standen, B. y Wein, S. (2023). Diet-independent positive effects of a multi-species probiotic on the growth performance and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in white leg shrimp. *Animals*, 13(3), 331. doi:10.3390/ani13030331
- Guo, J., Bolduc, B., Zayed, A.A., et al. (2021). VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome*, 9(1), 37. doi: 10.1186/s40168-020-00990-y.
- Gupta, R., Beg, Q. K. y Lorenz, P. (2015). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3665–3679. doi:10.1007/s00253-002-0975-y
- Gutiérrez-Leyva, R., Civera-Cerecedo, R., Rocha-Meza, S., Rondero-Astorga, D., Ramírez-Ramírez, C. y Casas-Valdez, M. (2015). Nutritional evaluation of seaweed *Macrocystis pyrifera* as feed additive for juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Abanico Veterinario*, 5(1), 26–34.

- Hadfield, J., Croucher, N.J., Goater, R.J., Abudahab, K., Aanensen, D.M. y Harris, S.R. (2017). Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics*, 34(2), 292–293. doi: 10.1093/bioinformatics/btx610.
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917–935. doi: 10.1111/jam.12886
- Hara, S., Hashimoto, M. y Kato, S. (2016). Environmental distribution and metabolic diversity of the *Bacillus pumilus* group. *Microbial Ecology*, 72, 55–67.
- Hardjani, D. K., Suantika, G. y Aditiawati, P. (2017). Nutritional profile of red seaweed *Kappaphycus alvarezii* after fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* as a feed supplement for white shrimp *Litopenaeus vannamei* nutritional profile of fermented red seaweed. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(4), 1637–45. doi:10.22207/jpam.11.4.01
- Hernández-Sain, A., Palacios-Mechetnov, E., Soto-Rodríguez, S.A., Osuna-Ruiz, I., Rojas-Hernández, P.G. y Hernández, C. (2025). Seaweed potential as nutraceutical and functional food ingredient in shrimp aquaculture. *Animal Feed Science and Technology*, 330, 116540. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2025.116540.
- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B.E. y Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(3), 255–266. doi: 10.1046/j.1365-2621.2003.00671.x.
- Huynh-Phuoc, V., Ly, T.Q., Purbiantoro, W., Ngo, H.V.T., Afonso, F., Vu, N.U. y Cheng, T.C. (2022). *Bacillus safensis* isolated from white-leg shrimp, *Penaeus vannamei*, in Taiwan with antagonistic activity against common *Vibrio* pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 44, 102477. doi: 10.1016/j.bcab.2022.102477.
- Iber, B. T. y Kasan, N. A. (2021). Recent advances in Shrimp aquaculture wastewater management. *Heliyon*, 7(11). doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08283
- Jain, C., Rodriguez, R.L.M., Phillippy, A.M., et al. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9(1), 5114. doi: 10.1038/s41467-018-07641-9.
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K. y McArthur, A.G. (2016). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D566–D573. doi: 10.1093/nar/gkw1004.
- Jiménez, M. V., Benítez, M. S. M., de Muñoz, F. L. G. G., and Brito, R. S. (2008). Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*, (7), 2.
- Junior, A.P.B., Flickinger, D.L. y Henry-Silva, G.G. (2021). Sedimentation rates of nutrients and particulate material in pond mariculture of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) carried out with different management strategies. *Aquaculture*, 534, 736307. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736307.
- Kamilari, E., O'Connor, P.M., Farias, F.M.D., Johnson, C.N., Buttimer, C., Deliephan, A. y Ross, R.P. (2025). *Bacillus safensis* APC 4099 has broad-spectrum antimicrobial activity against both bacteria and fungi and produces several antimicrobial peptides, including the novel circular bacteriocin safencin E. *Applied and Environmental Microbiology*, 91(1), e01942–24. doi: 10.1128/AEM.01942-24.

- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.11.019
- Kewcharoen, W. y Srisapoom, P. (2019). Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality, growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 94, 175–189. doi: 10.1016/j.fsi.2019.09.013.
- Khan, T.A., Liangliang, H., Attia, K.A., Bashir, S., Ziyuan, X., Alsubki, R.A. y Xia, L. (2025). *Bacillus velezensis* FiA2 as an oxydifficidin-producing strain and its effects on growth performance, immunity, intestinal microbiota, and resistance to *Aeromonas salmonicida* infection in *Carassius carassius*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 17, 3667–3683. doi: 10.1007/s12602-025-10485-7.
- Kim, K., Jung, J. Y. y Kwon, J. H. (2021a). Potential of bacterial strains isolated from coastal water for wastewater treatment and as aqua-feed additives. *Microorganisms*, 9(12), 2441. doi: 10.3390/microorganisms9122441
- Kim, S., Jeon, H., Han, H.S. y Hur, J.W. (2021b). Evaluation of *Bacillus albus* SMG-1 and *Bacillus safensis* SMG-2 as probiotics for aquaculture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Reports*, 20, 100743. doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100743.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. y Winn W.C. (1999). Diagnóstico Microbiológico. *Editorial Medica Panamericana*. Argentina. p. 631-644.
- Koneman, E. (1997). The Enterobacteriaceae in Diagnostic Microbiology. 5ª. Edición, Washington Square: Lippincott–Raven Publishers, 173-203.
- Kothari, V.V., Kothari, R.K., Kothari, C.R., Bhatt, V.D., Nathani, N.M., Koringa, P.G., Joshi, C.G. y Vyas, B.R.M. (2013). Genomic sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain VK isolated from saline desert area of Gujarat, India. *Genome Announcements*, 1, e00671-13. doi: 10.1128/genomeA.00671-13.
- Kuebutornye, F.K., Abarike, E.D. y Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 87, 820-828. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.010.
- Kumar, D., Parshad, R. y Gupta, V. K. (2014). Application of a statistically enhanced, novel, organic solvent stable lipase from *Bacillus safensis* DVL-43. *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 97-107. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.015
- Kureshy, N. y Davis, D. A. (2002). Protein requirements for maintenance and maximum weight gain for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204(1), 125-143. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00649-4.
- Laredo, J., Wolff, V.L. y Lovett, P.S. (1988). Chloramphenicol acetyltransferase specified by cat-86: relationship between the gene and the protein. *Gene*, 73(1), 209–214. doi: 10.1016/0378-1119(88)90327-7.
- Lemos, D., Ezquerro, J.M. y García-Carreño, F.L. (2000). Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*, 186, 89–105. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00371-3.
- Li, X., Deng, X., Hou, D., Zeng, S., Deng, Z., Zhou, R. y Huang, Z. (2024). Effects of water ammonia nitrogen on hemolymph and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*. *Advanced Biotechnology*, 2(1), 1. doi:10.1007/s44307-023-00008-2

- Lin, Y.H. y Chen, Y.T. (2022). *Lactobacillus* spp. fermented soybean meal partial substitution to fish meal enhances innate immune responses and nutrient digestibility of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low fish meal diet. *Aquaculture*, 548, 737634. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737634.
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L. y Yang, J. (2018). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D687–D692. doi: 10.1093/nar/gky1080.
- Liu, W.T., Yang, Y.L., Xu, Y., Lamsa, A., Haste, N.M., Yang, J.Y. y Dorrestein, P.C. (2010). Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37), 16286–16290. doi: 10.1073/pnas.1005958107.
- Llario, F., Falco, S., Sebastián-Frasquet, M. T., Escrivá, J., Rodilla, M. y Poersch, L. H. (2019). The role of *Bacillus amyloliquefaciens* on *Litopenaeus vannamei* during the maturation of a biofloc system. *Journal of Marine Science and Engineering*, 7(7), 228. doi:10.3390/jmse7070228
- Logan, N. A. y De Vos, P. (2015). *Bacillus* spp. and related genera. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00530
- Mac Faddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana.
- Martínez-Córdova, L. R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A. y Martínez-Porchas, M. (2015). Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Reviews in Aquaculture*, 7(2), 131-148. doi:10.1111/raq.12058
- Mathur, S. y Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281-295. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008.
- Matos, J., Cardoso, C., Serralheiro, M.L., Bandarra, N.M. y Afonso, C. (2024). Seaweed bioactives potential as nutraceuticals and functional ingredients: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 133, 106453. doi: 10.1016/j.jfca.2024.106453.
- Melchor-Martínez, E.M., Reyes, A.G., Morreeuw, Z.P., Flores-Contreras, E.A., Araújo, R.G., Ramírez-Gamboa, D. y Parra-Saldívar, R. (2023). Comparative study on the valorization of *Sargassum* from the Mexican Caribbean coast and Gulf of California as an ingredient in shrimp diets. *Aquaculture Reports*, 32, 101709. doi: 10.1016/j.aqrep.2023.101709.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Børgwald, J. y Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2), 1-18. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.007
- Métais, P. y Bieth, J. (1968). Determination of alpha-amylase by a microtechnic. *In Annales de biologie Clinique* 26(1), 133–142.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. J. y McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45(05), 31-34. doi:10.1055/s-2007-971236
- Molina, C. (2009). Feed programs: maximizing feed and feeding efficiency in shrimp farming. En: Browdy, C.L. y Jory, D.E. (eds.), *The rising tide: proceedings of the special session on sustainable shrimp farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 218–229.
- Monier, M.N., Kabary, H., Elfeky, A., Saadony, S., El-Hamed, N.N.B., Eissa, M.E.H. y Eissa, E.H. (2023). Effects of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* probiotics on water quality, immune

- responses and resistance of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Fusarium solani*. *Aquaculture International*, 31: 3437–3455. doi: 10.1007/s10499-023-01136-1.
- Moriarty, D. J. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151(1-4), 333-349. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01487-1.
- Múzquiz de la Garza, A.R., Tapia-Salazar, M., Maldonado-Muñiz, M., de la Rosa-Millán, J., Gutiérrez-Urbe, J.A., Santos-Zea, L. y Cruz-Suárez, L.E. (2019). Nutraceutical potential of five Mexican brown seaweeds. *BioMed Research International*, 2019, 1–12. doi: 10.1155/2019/3795160
- Nakano, M.M., Hoffmann, T., Zhu, Y. y Zuber, P. (1998). Identification of genes induced during anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 180(2), 534–541. doi: 10.1128/JB.180.2.534-541.1998.
- Nayak, S.K. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1): 2–14. doi: 10.1016/j.fsi.2010.02.017.
- Nayak, S.K. (2021). Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 862-906. doi:10.1111/raq.12503
- Nieto-López, M., Tapia-Salazar, M., Ricque-Marie, D., Villarreal-Cavazos, D., Lemme, A. y Cruz-Suárez, L.E. (2011). Digestibility of different wheat products in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 319, 369–376. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.06.046.
- Nunes, A.J., Dalen, L.L., Leonardi, G. y Burri, L. (2022). Developing sustainable, cost-effective and high-performance shrimp feed formulations containing low fish meal levels. *Aquaculture Reports*, 27, 101422. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101422.
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G. y Pitones, V. (2020). *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of microbiology*, 202(3), 427-435. doi:10.1007/s00203-019-01757-2
- Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J. y Contreras, R. (2011). Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* probiotic strains. *Marine drugs*, 9(6), 1119-1132. doi:10.3390/md9061119
- Omont, A., Elizondo-González, R., Escobedo-Fregoso, C., Tovar-Ramírez, D., Hinojosa-Baltazar, P. y Peña-Rodríguez, A. (2021). Bacterial communities and digestive enzymatic activities of *Litopenaeus vannamei* fed pre-digested seaweeds as a functional ingredient. *Journal of Applied Phycology*, 33, 1239–1251. doi: 10.1007/s10811-021-02381-8.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A. y Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421.
- Page, A.J., Cummins, C.A., Hunt, M., Wong, V.K., Reuter, S., Holden, M.T.G., Fookes, M., Falush, D., Keane J.A. y Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421.
- Peña-Rodríguez, A., Omont, A. y Elizondo-González, R. (2022). Valorización de Macroalgas para su uso como alimento acuícola. *Avances En Nutrición Acuicola*, 1(1), 294–315.
- Pérez-Sanchez T., Ruiz-Zarzuela I., de Blas I., Balcazar J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6: 133–146. doi: 10.1111/raq.12033

- Ponce-Palafox, J. T., Cruz, O. R., Vargasmachuca, S. C., Nochebuena, P. A., Ulloa-García, M., Sala, R. G. y Lea, H. E. (2006). El desarrollo sostenible de la acuicultura en América Latina. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(7), 1-16.
- Pourmozaffar, S., Reverter, M., Jahromi, S.T., Harikrishnan, R., Pazir, M.K., Barzkar, N., Mozanzadeh, M.T., Sarvi, B., Abolfathi, M., Adeshina, I., Behzadi, S. y Raji, A. (2025). Biological functions and mechanisms of action of medicinal plants and seaweeds in shrimp culture. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 109, 291–337. doi: 10.1111/jpn.14049.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. (2004). *Microbiología*. 5ª ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Rahayu, S., Amoah, K., Huang, Y., Cai, J., Wang, B., Shija, V.M., Jin, X., Anokyewaa, M.A. y Jiang, M. (2024). Probiotics application in aquaculture: potential effects, current status in China and future prospects. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1455905. doi: 10.3389/fmars.2024.1455905.
- Reboleira, J., Silva, S., Chatzifragkou, A., Niranjana, K. y Lemos, M. F. (2021). Seaweed fermentation within the fields of food and natural products. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 1056-1073. doi: 10.1016/j.tifs.2021.08.018
- Rezende, P.C., Miranda, C., Fracalossi, D.M., Hayashi, L., Seiffert, W.Q., do Nascimento Vieira, F. y Schleder, D.D. (2022). Brown seaweeds as feed additive for *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system improve resistance to thermal stress and white spot disease. *Journal of Applied Phycology*, 34: 2603–2614. doi: 10.1007/s10811-022-02760-9.
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R. y Song, S. K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 129(1), 116-136. doi:10.1111/jam.14628
- Rodríguez-González, H., Orduña-Rojas, J., Villalobos-Medina, J.P., García-Ulloa, M., Polanco-Torres, A., López-Álvarez, E.S., Montoya-Mejía, M. y Hernández-Llamas, A. (2014). Partial inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Applied Phycology*, 26, 2453–2459. doi: 10.1007/s10811-014-0272-z.
- Rollo, A., Sulpizio, R., Nardy, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A. y Carnevali, O. (2006). Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(2), 167–177. doi: 10.1007/s10695-006-0009-2.
- Sadat Hoseini Madani, N., Adorian, T. J., Ghafari Farsani, H. y Hoseinifar, S. H. (2018). The effects of dietary probiotic *Bacilli* (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture Research*, 49(5), 1926-1933. doi:10.1111/are.13648
- Sampath, H., Veerasamy, G. y Mukkalil, R. (2025). Harnessing *Bacillus* probiotics: an approach for *Vibrio* pathogen control and organic sludge management in shrimp aquaculture. *Aquaculture Research*, : 2767593. doi: 10.1155/are/2767593.
- Satomi, M., La Duc, M. T. y Venkateswaran, K. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1735-1740. doi:10.1099/ijs.0.64189-0
- Schallmeyer, M., Singh, A. y Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production of enzymes. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1–17. doi:10.1139/w03-076

- Schleder, D.D., Peruch, L.G.B., Poli, M.A., Ferreira, T.H., Silva, C.P., Andreatta, E.R., Hayashi, L. y do Nascimento Vieira, F. (2018). Effect of brown seaweeds on Pacific white shrimp growth performance, gut morphology, digestive enzymes activity and resistance to white spot virus. *Aquaculture*, 495, 359–365. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.020.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30, 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Sha, H. N., Lu, Y. M., Zhan, P. P., Chen, J., Qiu, Q. F. y Xiong, J. B. (2025). Beneficial effects of probiotics on *Litopenaeus vannamei* growth and immune function via the recruitment of gut Rhodobacteraceae symbionts. *Zoological Research*, 46(2), 388. doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2024.364
- Shiu, Y. L., Wong, S. L., Guei, W. C., Shin, Y. C. y Liu, C. H. (2015). Increase in the plant protein ratio in the diet of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as a replacement. *Aquaculture Research*, 46(2), 382-394. doi:10.1111/are.12186
- Silva, R.T., Eugenio, V.S.N., Ana, L.T.G.R., et al. (2018). Antimicrobial, antiparasitic and antiproliferative effects of the extract of *Bacillus safensis* SG-32 isolated from a Brazilian oil reservoir. *African Journal of Microbiology Research*, 12(37), 897–907. doi: 10.5897/ajmr2018.8940.
- Skinnider, M.A., Johnston, C.W., Gunabalasingam, M., et al. (2020). Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nature Communications*, 11(1), 6058. doi: 10.1038/s41467-020-19986-1.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P., Tackaert, W. y Versichele, D. (1998). *The use of Artemia in aquaculture: current developments*. *Hydrobiologia*, 358(1–3) (a veces citado dentro de la serie 367), 295–310. doi: 10.1023/A:1003249727135
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
- Sun, H., He, Y., Xiao, Q., Ye, R. y Tian, Y. (2013). Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum*. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 1496–1504. doi:10.5897/ajmr12.899
- Tirumalai, M. R., Stepanov, V. G., Wünsche, A., Montazari, S., Gonzalez, R. O., Venkateswaran, K. y Fox, G. E. (2018). *Bacillus safensis* FO-36b and *Bacillus pumilus* SAFR-032: a whole genome comparison of two spacecraft assembly facility isolates. *BMC microbiology*, 18(1), 57. doi:10.1186/s12866-018-1191-y
- Toledo, E.M., Moyano-López, F.J., Tovar-Ramírez, D., Strüssmann, C.A., Álvarez-González, C.A., Martínez-Chávez, C.C. y Martínez-Palacios, C.A. (2011). Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*, 42, 776–786. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02853.x.
- Vaishampayan, P., Miyashita, M., Ohnishi, A., Satomi, M., Rooney, A. P. y Venkateswaran, K. (2010). Description of *Bacillus safensis* sp. nov. and comparative genomic analyses of *Bacillus safensis* and *Bacillus pumilus* isolates from spacecraft assembly facilities. *Standards in Genomic Sciences*, 3(1), 1–14. doi: 10.4056/sigs.1192894.
- Valente, C. de S., Rodiles, A., Marques, M.R.F. y Merrifield, D.L. (2020). White spot syndrome virus (WSSV) disturbs the intestinal microbiota of shrimp (*Penaeus vannamei*) reared in biofloc and clear seawater.

- Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(18), 8007–8023. doi: 10.1007/s00253-020-10816-4.
- van Heel, A.J., de Jong, A., Song, C., et al. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W278–W281. doi: 10.1093/nar/gky383.
- Vandeputte, M., Coppens, S., Bossier, P., et al. (2024). Genomic mining of *Vibrio parahaemolyticus* highlights prevalence of antimicrobial resistance genes and new genetic markers associated with AHPND and tdh+/trh+ genotypes. *BMC Genomics*, 25, 178. doi: 10.1186/s12864-024-10093-9.
- Vanhaecke, P. y Sorgeloos, P. (1980). International study on Artemia. III. Standardization of conditions for Artemia cyst hatching. *Marine Ecology Progress Series*, 3, 161–165.
- Vernikos, G.S. y Parkhill, J. (2006). Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics*, 22, 2193–2206. doi: 10.1093/bioinformatics/btl369.
- Viteri Flórez, P. A., Castillo Guerra, D. A. y Viteri Rosero, S. E. (2015). Development and evaluation of an inoculum of cellulolytic bacteria. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 207-215. doi:10.31910/rudca.v18.n1.2015.470
- Waghmare, P. R., Kshirsagar, S. D., Saratale, R. G., Govindwar, S. P. y Saratale, G. D. (2014). Production and characterization of cellulolytic enzymes by isolated *Klebsiella sp.* PRW-1 using agricultural waste biomass. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26, 44-59. doi:10.9755/ejfa.v26i1.15296
- Wang, Y. B. (2007). Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269(1-4), 259-264. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.05.035
- Weisskopf, L. (2013). The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. En: Méndez-Vilas, A. (ed.). *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. Formatex, pp. 1352–1363.
- Wishart, D.S., Han, S., Saha, S., et al. (2023). PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Research*, 51(1), 443–450. doi: 10.1093/nar/gkad382.
- Wu, P. S., Liu, C. H. y Hu, S. Y. (2021). Probiotic *Bacillus safensis* NPUST1 administration improves growth performance, gut microbiota, and innate immunity against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Microorganisms*, 9(12), 2494. doi:10.3390/microorganisms9122494
- Wu, Z., Hao, H., Tu, Y., Hu, Z., Wei, F., Liu, Y., Zhou, Y., Wang, Y., Xie, G., Gao, C., Cai, X., Peng, L. y Wang, L. (2014). Diverse cell wall composition and varied biomass digestibility in wheat straw for bioenergy feedstock. *Biomass and Bioenergy*, 70, 347–355. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.08.025.
- Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C.R., et al. (2014). Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1), 68–74. doi: 10.1016/j.fsi.2013.10.007
- Zokaeifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A. y Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene

expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and shellfish immunology*, 33(4), 683-689. doi:10.1016/j.fsi.2012.05.027

Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K. y Lazado, C. C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary quarterly*, 36(4), 228-241. doi: 10.1080/01652176.2016.1172132

11. ANEXOS

Anexo A. Artículo Publicado Genomic study and characterization of *Bacillus safensis* and their potential use in white shrimp (*Penaeus vannamei*) farming



Latin American Journal of Aquatic Research



LAJAR/08/2026

Chile, Valparaíso, 14 de abril de 2026

Sr. Eduardo Quiroz-Guzmán
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)
La Paz, B.C.S.
MÉXICO

Estimado Sr. Quiroz-Guzmán:

Mediante la presente le informo que el artículo “**Genomic study and characterization of *Bacillus safensis* and their potential use in white shrimp (*Penaeus vannamei*) farming**” (3508), de los autores María A. Liñán-Vidriales, Alberto Peña-Rodríguez, Liliana Rojo-Arreola, Norma Angelica Ochoa-Álvarez, Jesús Martín Ramírez-Orozco, Irais Ramírez-Sánchez & Eduardo Quiroz-Guzmán, ha sido aceptado para ser publicado en el Número 54(3) de julio de 2026 de la Revista Latin American Journal of Aquatic Research (LAJAR).

Le saluda cordialmente,








Dr. Sergio Palma
Editor Jefe

Latin American Journal of Aquatic Research

cc: Archivo.

Research Article

Genomic study and characterization of *Bacillus safensis* and its potential use in white shrimp (*Penaeus vannamei*) farming

María A. Liñan-Vidriales¹ , Alberto Peña-Rodríguez¹ , Liliana Rojo-Arreola¹ 
Norma Angelica Ochoa-Álvarez¹ , Jesús Martín Ramírez-Orozco¹ 
Irais Ramírez-Sánchez¹  & Eduardo Quiroz-Guzmán¹ 

¹Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), La Paz, Mexico
Corresponding author: Eduardo Quiroz-Guzmán (equiroz@cibnor.mx)

ABSTRACT. *Bacillus safensis* has emerged as a promising probiotic candidate in aquaculture due to its metabolic versatility and antagonistic activity against pathogenic bacteria. In this study, two morphotypes of *B. safensis* (BS1-A and BS1-B) were characterized using biochemical and genomic analyses, and their effects on the productive performance of white shrimp (*Penaeus vannamei*) were evaluated. Both morphotypes exhibited Gram-positive, rod-shaped cells; punctiform colonies with entire margins and flat elevation; carbohydrate fermentation; indole production; lack of motility; and the ability to produce protease and cellulase enzymes. Whole-genome sequencing of BS1-A revealed a genome size of 3,686,099 bp. Average nucleotide identity (ANI) analysis showed 99.999% identity between BS1-A and BS1-B and 97.46% identity with the reference strain PgKB20. Shrimp bioassays were conducted over six weeks using three treatments in a juvenile white shrimp culture system: control (1% molasses), BAC (1% molasses plus *B. safensis* at a final concentration of 2.50×10^7 CFU mL⁻¹), and COM (1% molasses plus a commercial probiotic at the same concentration). At the end of the experimental period, significant differences ($P < 0.05$) were observed among treatments in growth performance, weight gain, feed consumption, and survival. Under the experimental conditions evaluated, the results suggest that *B. safensis* BS1-A and BS1-B contribute to improved digestion and nutrient absorption from balanced feed, thereby enhancing shrimp growth performance.

Keywords: *Bacillus safensis*; probiotic; shrimp; genome; aquaculture

INTRODUCTION

In recent years, aquaculture has become the fastest-growing sector worldwide (Wenning 2020). However, bacterial infections have significantly hindered global development over the past decades, causing substantial economic losses (Kaktcham et al. 2018, Reda et al. 2018, Magray et al. 2020, Kang et al. 2022). Moreover, the excessive use of antibiotics to control pathogenic bacteria has increased the prevalence of antibiotic-resistant bacteria and led to environmental contamination on farms (Limbu et al. 2021, Kang et al. 2022).

Consequently, several studies have focused on developing new biological control strategies, with probiotics emerging as a viable alternative to mitigate the impacts of these chemotherapeutic agents (Hoseinifar et al. 2018).

According to the World Health Organization (WHO), probiotics are live microorganisms that confer health benefits to the host when administered appropriately (Kang et al. 2022). Therefore, in recent years, some species, such as *Bacillus* sp., *Clostridium butyricum*, *Enterococcus* sp., and *Rhodopseudomonas* sp., have been widely used (Wang et al. 2019). Their

application in aquaculture has demonstrated improvements in growth, survival, and immune response of organisms, as well as in disease control and water quality (Ringo et al. 2018, Zabidi et al. 2021, Kang et al. 2022, Rohani et al. 2022, Yilmaz et al. 2022). Several studies have shown that probiotics isolated from shrimp or fish farming systems are more effective in aquaculture than those isolated from unrelated sources, as they are adapted to the same environment (Zhang et al. 2022). Therefore, the selection and application of autochthonous probiotics from aquaculture systems have become increasingly important.

Characterizing probiotic strains isolated from culture systems or organisms is a primary requirement for selecting candidate strains. Among the essential traits, it is crucial to verify their ability to persist, adhere to, and colonize the intestine and evaluate their antioxidant and antibacterial properties (Xie et al. 2023, Yang et al. 2023). Another critical aspect is genome sequencing and functional annotation, which provide effective tools for exploring the molecular mechanisms of probiotics, thereby aiding in the selection of beneficial strains (de Melo-Pereira et al. 2018). In this regard, bacterial genome analysis focuses on identifying molecular markers that confer probiotic properties, such as adhesion, antimicrobial production, and biological safety (Kapse et al. 2019), including the absence of virulence genes or toxin production.

The genus *Bacillus* is one of the most commonly used effective probiotic supplements in aquaculture (Abdel-Tawwab et al. 2022, Monier et al. 2023). It produces various extracellular enzymes, tolerates UV light, and withstands both low and high temperatures, allowing it to remain dormant for extended periods (Nicholson 2004). Various studies have demonstrated that they can significantly improve the physiological, morphological, hematological, and immunological conditions of aquatic organisms when administered at optimal levels in the culture water.

Most studies have investigated the probiotic traits of *Bacillus* species using *in vitro* and *in vivo* models (Kavitha et al. 2018). In the case of *Bacillus safensis*, one of the most widespread species found in a wide range of marine and terrestrial habitats (Singh et al. 2013, Lateef et al. 2015, Wu et al. 2021), some studies have explored its antibacterial activity (Abdelli et al. 2019, Vinh et al. 2022) and its enzymatic profile (Kothari et al. 2013).

These characteristics indicate that this bacterium has great potential for biotechnological applications across various industries (Rekik et al. 2019, Thite et al. 2020). However, information on its genome and some

of its biochemical properties is scarce. Therefore, the present study aimed to characterize the genome and biochemical properties of two *B. safensis* morphotypes to evaluate their potential as probiotics in white shrimp (*Penaeus vannamei*) farming.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification

The *B. safensis* used in this study was isolated from a marine sponge (Galicia-Nicolás et al. 2018) and initially exhibited two distinct colonial morphotypes, one large (BS1-A) and one small (BS1-B). Both morphotypes were evaluated under identical experimental conditions, and all procedures were applied equally. To verify that the morphotypes represented natural phenotypic variants rather than mutants or contaminants, whole-genome sequencing was performed at Plasmidsaurus Lab (San Francisco, USA), complemented by biochemical metabolic profiling. Bacteria were cultured on tryptic soy agar supplemented with 2.5% NaCl (trypto-casein soy agar, TSA+) at 35°C for 24 h. Cells were harvested by centrifugation (3,600 g, 4°C, 10 min), adjusted to an optical density of $OD_{600} = 1$ in 2.5% NaCl saline solution, and quantified as colony-forming units (CFU mL^{-1}) by plating serial dilutions on TSA+.

Characterization of *Bacillus safensis*

The cellular morphological characterization of BS1-A and BS1-B was conducted by microscopic observation and Gram staining. According to the methodology described by Mac Faddin (1980) and Díaz et al. (1995), with modifications, the following biochemical characterization tests were performed: motility, indole, and ornithine production in motility, indole, and ornithine (MIO) medium (BD Bixon). Simmons' citrate, catalase, oxidase, and methyl red using the strains *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, and *Staphylococcus aureus* as positive and negative controls, as appropriate. The fermentation of different carbohydrates, including glucose, lactose, mannitol, sorbitol, arabinose, trehalose, xylose, galactose, and maltose, was evaluated. As part of the physiological characterization, growth at temperatures ranging from 4 to 45°C and the effects of different NaCl concentrations (0-13%) were determined. Specific culture media were used to assess protease, amylase, and cellulase production. The culture media used were as follows: 1.5% gelatin agar, revealing agent: acidified mercuric chloride (Mac Faddin 1980); 1% starch agar, revealing agent: Lugol's iodine; 1% carboxymethyl

cellulose (CMC) agar, revealing agent: 0.05% Congo red (Viteri et al. 2015).

Inoculum preparation and typical growth curve

A colony of BS1-A and BS1-B was taken from a TSA+ plate grown for 24 h and inoculated into a flask containing 20 mL of TSB+2.5% NaCl (TSB+). The culture was incubated at 30°C and 100 rpm for 18 h. This culture was adjusted to an optical density of 1.0 (600 nm) and used to inoculate 200 µL of fresh TSB+ in a microplate well (ratio of 1:10). The microplate was incubated at 30°C in a microplate reader and programmed to measure optical density every hour at a wavelength of 600 nm for 48 h (MultiskanGo, Thermo Scientific). Three independent replicates were performed for each bacterial growth curve.

The growth curves for BS1-A and BS1-B were established by plotting bacterial cell numbers over time, and the specific growth rate was determined using an empirical growth model (Eq. 1). To the growth curve, bacterial concentration was estimated as cells per milliliter from colony-forming units by plating serial dilutions on TSA+.

$$\mu = \text{Ln}(N/N_0) / \Delta T \quad (\text{Eq. 1})$$

where: N: final cell number; N₀: initial cell number; ΔT: time period from N₀ to N.

Dot-spot technique for antagonistic activity assay

Pathogenic bacteria of the genus *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. diabolicus*, and *V. harveyi*) were obtained from the collection of the Phage and Microalgae Biotechnology Laboratory at CIBNOR. They were identified by genome sequencing (unpubl. data). All isolates were cultured separately on TSA+ supplemented with 2.5% NaCl for 24 h at 30°C before the experiment. Suspensions of the pathogenic bacteria were adjusted to an approximate concentration of 10⁷ CFU mL⁻¹ based on an absorbance of 1 at 600 nm (OD₆₀₀) and evenly spread onto TSA+ plates. The concentrated suspension of each isolate containing pathogenic bacteria was inoculated onto the plates. Morphotypes BS1-A and BS1-B were evaluated in triplicate by adding 5 µL of each one onto sterile filter paper disks at a concentration of 10⁸ CFU mL⁻¹, based on an absorbance of 1 at 600 nm (OD₆₀₀). As a control, three filter paper disks containing 30 µg of chloramphenicol were placed on the opposite side of the plates (Chen et al. 2024). Plates were incubated at 30°C for 24 h. After incubation, disks exhibiting inhibition halos were considered to show antagonistic activity, and the diameters of the inhibition zones were

recorded (Kewcharoen & Srisapoom 2019). To confirm antagonistic activity, the procedure was repeated twice for isolates that exhibited inhibition halos against at least one *Vibrio* species.

Genomic DNA of BS1-A and BS1-B

Genomic DNA from morphotypes BS1-A and BS1-B was extracted using the QIAamp DNA Microbiome Kit according to the manufacturer's instructions. DNA quality was evaluated by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels, and its concentration was measured using a NanoDrop ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

Bioinformatic analysis

Whole Plasmid Sequencing was performed by Plasmidsaurus using Oxford Nanopore Technology with custom analysis. The assembled genome was initially annotated and inspected with Prokka 1.14.6 (Seemann 2014), then annotated with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. The average nucleotide identity was calculated using FastANI v1.1.0 (Jain et al. 2018). Data were analyzed with Alien Hunter 1.1.0 (Vernikos & Parkhill 2006) to identify potential horizontal gene transfer events, and with Phastest 3.0 v1.0.1 (Wishart et al. 2023) and VirSorter2 (Guo et al. 2021) to identify phage sequences. ResFinder v4.7.2 (Clausen et al. 2018, Bortolaia et al. 2020), AMRFinderPlus v4.0.23 (Feldgarden et al. 2021), and the Resistance Gene Identifier (RGI) v6.0.0 were used to search for resistance genes using the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (Alcock et al. 2023). Vfanalyzer was used to search for virulence factors in the VFDB (Liu et al. 2018). Finally, antiSMASH 7.0 (Blin et al. 2023), Prism4 (Skinnider et al. 2020), and BAGEL4 (van Heel et al. 2018) were used to find secondary metabolic clusters. The circular genome representation was obtained using the PROKSEE server (Grant et al. 2023). The pangenomes of morphotypes BS1-A and BS1-B were analyzed and compared with those of four closely related strains from the NCBI database. We downloaded 36 complete *B. safensis* genome records from the NCBI databases, used the FASTA files as input for Prokka, and conducted a pangenome analysis using Roary v3.13.0 (Page et al. 2015). The resulting core gene alignment was used as input for trimAl v1.5.rev1 (Capella-Gutiérrez et al. 2009) and finally RaxMLv8.2.12 (Stamatakis 2014) were used to obtain the maximum likelihood phylogenetic tree using 100 bootstrap replicates. The gene presence/absence matrix obtained from Roary and the tree generated in RaxML

were used as input to Phandango (Hadfield et al. 2017) to generate a pangenome heatmap.

Probiotic and feed preparation for bioassay

Preserved working stocks in pure glycerol at -18°C were inoculated into flasks containing 20 mL of TSB+ and incubated with agitation at 110 rpm at 30°C for 24 h. Each morphotype was centrifuged in 50-mL tubes at 3,600 g for 15 min, and the supernatant was decanted. The obtained pellets were resuspended in 20 mL of 2.5% saline solution, vortexed, and the optical density (λ 600 nm) was measured to determine the volume required to achieve a final concentration of 2.50×10^7 CFU mL^{-1} in the experimental culture tanks.

A shrimp-balanced feed was formulated (Table 1) and manufactured in the aquaculture nutrition laboratory at CIBNOR. All dry ingredients were mixed until homogenized in a 1.5 L mixer (Kitchen-Aid™, USA), then oil-based ingredients and warm water (350 mL kg^{-1} at 60°C) were added, and the mixture was homogenized until a wet dough formed. The mixture was passed through a meat grinder (0.5 hp Torrey®, MX) through a 2-mm die-cutting. Finally, the pellets were dried for 10% moisture at 45°C for 10 h in a forced-air oven and stored at 4°C . The feed was analyzed for dry matter (Method 930.15; AOAC 2005), crude protein (Ebeling 1968), total lipids (Method 2003.05; AOAC 2005), crude fiber (Method 978.10; AOAC 2005), and ash (Method 942.05; AOAC 2005). Nitrogen-free extract (NFE) was estimated by difference.

Shrimp bioassay with *Bacillus safensis*

Pacific white shrimp *P. vannamei* post-larvae (~80 mg) were kindly donated by the commercial laboratory Biomarina SA de CV located in Mazatlán, Sinaloa, Mexico. The shrimp were acclimated in 800-L tanks to the following conditions: dissolved oxygen ≥ 4.5 g L^{-1} , $28.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$, pH 7.8 ± 0.3 , $\text{NH}_3 < 0.5$ ppm, 37 of salinity, and photoperiod of 12:12 h: light:dark (fluorescent light). Shrimp were fed a commercial diet (Purina 35% protein) for three weeks before the experiment. After the acclimation period under laboratory conditions, a six-week experiment was conducted to evaluate three treatments: control (no probiotic), BAC (a mix of equal parts of BS1-A and BS1-B at a final concentration in the experimental tanks of 2.5×10^4 CFU mL^{-1}), and commercial probiotic (COM, Hatchery Prime which contains *Bacillus* sp. at a final concentration in the experimental tanks of 2.5×10^4 CFU mL^{-1}). All treatments received 1 mg L^{-1} molasses in the water daily, which was increased to 1.5

Table 1. Ingredient composition (g kg^{-1} diet) and proximate analysis (% dry basis) of feed. ^aPMA S.A. de C.V., Jalisco, MX. ^bPIASA S.A. de C.V., Baja California Sur, MX. ^cMolino San Cristóbal, Sonora, MX. ^dCedrosa SA de CV, Estado de México, MX. ^eSigma Aldrich, Missouri, USA. ^fVitamin and mineral premix: detailed content in Peña-Rodríguez et al. (2020). ^gPrilabsa, Sinaloa, MX.

Ingredients	g kg^{-1} diet
Fish meal ^a	180
Soybean meal ^b	341.3
Wheatmeal ^c	400
Soy lecithin ^d	35
Fish oil ^a	25
Alginic acid ^e	10
Vitamin-mineral premix ^f	5.3
Antioxidant BHT ^e	0.4
Vitamin C ^g	1
Choline ^e	1
Sodium biphosphate ^e	1
Total	1000
Proximate analysis	% dry basis
Crude protein	34.3 ± 0.5
Lipids	8.7 ± 0.1
Crude fiber	0.43 ± 0.1
Ash	6.7 ± 0.1
NFE	49.8

and 2 mg L^{-1} during the fourth and fifth weeks of the experiment, respectively, to provide additional carbon to control ammonia in the culture water due to increased shrimp biomass and feed ration. The respective probiotic and molasses were added daily throughout the experimental period. Each treatment consisted of four replicates, with 11 shrimp (wet average weight of 0.5 ± 0.3 g) randomly distributed in 60 L fiberglass tanks with a controlled photoperiod and a temperature of $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, and continuous aeration. Throughout the experimental period, tank water samples were taken weekly for water quality analysis in terms of total ammonia nitrogen (TAN), nitrites, nitrates, phosphate, and pH (API Marine, saltwater master test kit, FL, USA), and total sedimentable solids (TSS) particles were quantified per triplicate in mL L^{-1} using 1-L Imhoff cones every four days. Shrimp were fed to satiety at an initial rate of 10% shrimp biomass, divided into two rations (09:00 and 14:30 h). Feeding rates were adjusted based on the remaining feed observed during a daily 10% water exchange performed

by siphoning. Biometrics were performed weekly until the end of the experiment, and the following parameters were evaluated: final weight (g), percentage of weight gain (WG), specific growth rate (SGR% d⁻¹), feed conversion ratio (FCR), and survival.

Statistical analysis

Shrimp performance and water were analyzed using tank averages (n = 4), tested for normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Levene's test), and then subjected to one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple-comparison tests if applicable (95% confidence level). For water quality parameters, a two-way ANOVA was conducted to evaluate the effects of time (week) and treatment, with Tukey's *post-hoc* tests applied when significant effects were detected. All statistical analyses were carried out using R software (version 4.4.1).

RESULTS

Biochemical and physiological characterization of *Bacillus safensis* morphotypes BS1-A and BS1-B

Both morphotypes exhibited Gram-positive rod-shaped morphology, punctiform colony shape, entire edge, flat elevation, and smooth bright color. They were positive for ornithine, capable of fermenting a range of carbon sources, negative for motility and indole, positive for catalase, and demonstrated growth starting at 15°C. The two morphotypes of *B. safensis* differed in biochemical activity despite being the same species. It was determined that BS1-A was citrate-positive and grew in 10% NaCl, whereas BS1-B was citrate-negative and grew only up to 6% NaCl (Table 2). Both *B. safensis* morphotypes tested positive for protease and cellulase production (Table 3); however, their quantitative activity still needs to be determined.

Bacteria growth curve

The growth curve for both *B. safensis* morphotypes was carried out for 48 h; the constructed graph of natural logarithms of the cells per milliliter as a function of the culture time indicates that the lag phase of growth is practically non-existent and that the logarithmic phase of growth ends at 18 h of culture for both morphotypes, (Fig. 1). The phase of cell death was not determined for this experiment, so the reading values remained static for the rest of the culture time, indicating no diauxic growth, as observed in other bacteria. The statistical analysis of the specific growth rate shows no difference between the two determinations ($P > 0.05$), indicating

high similarity in the medium-uptake efficiency of BS1-A and BS1-B.

Screening of bacteria with antagonistic activity bacteria

Both morphotypes of *B. safensis* were tested for their antagonistic activity against three pathogenic *Vibrio* species. The results showed that both could inhibit the growth of at least one *Vibrio* bacterium, with one BS1-A exhibiting strong activity against all three tested *Vibrio* species (Table 4).

Identification of *Bacillus safensis* BS1-A and BS1-B

After sequencing, a total of 157,576 reads were obtained, with an rN50 value of 3,651 bp and a coverage of 98.13X. Detailed assembly statistics are presented in Table 5. The *B. safensis* BS1-A genome was uploaded to the NCBI database (BioProjectID: PRJNA1363193) and consists of 3,686,099 bp and a GC content of 41.76% (Fig. 2). The Average Nucleotide Identity (ANI) between BS1-A and BS1-B and the *B. safensis* reference genome strain PgKB20 (NZ_CP043404.1) showed a 97.46 ANI value. The genome of the second morphotype was sequenced and showed an ANI value of 99.999 between *B. safensis* BS1-A and BS1-B.

Among the genomic features, phage genes encoding terminase, structural proteins, and holins were identified using two software tools, Phastest and VirSorter, providing evidence of a prophage in *B. safensis* BS1-A. The antiSMASH analysis identified several gene clusters associated with the synthesis of secondary metabolites, including lichenisin, plantazolicin, and bacilysin. However, when analyzing antibiotic resistance genes using CARD and the NCBI Gene database, both programs (RGI and ResFinder) identified the *cat86-1* gene in *B. safensis* BS1-A, showing 90-100% identity across other *Bacillus* sp. strains reported in NCBI.

Genome annotation identified 3,709 genes, including phage-related genes encoding terminase, structural proteins, and holins. These features were detected using both PHASTest and VirSorter, providing evidence of a prophage in *B. safensis* BS1-A. Additionally, antiSMASH analysis revealed multiple gene clusters associated with the biosynthesis of secondary metabolites, including lichenisin, plantazolicin, and bacilysin. Analysis of antibiotic resistance genes using the CARD and NCBI Gene databases showed that both RGI and ResFinder identified the *cat86-1* gene in *B. safensis* BS1-A, which exhibits 90-

Table 2. Biochemical and physiological characterization of *B. safensis* BS1-A and BS1-B. NA: not applicable; (-) negative; (+) positive.

	Morphotype		Controls		
	BS1-A	BS1-B	<i>E. coli</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Motility	-	-	+	+	-
Indole	-	-	+	-	-
Ornithine	+	+	+	+	-
Simmons citrate	+	-	-	+	-
Catalase	+	+	NA	NA	+
Oxidase	-	-	-	NA	NA
Methyl red	-	-	+	-	NA
Carbohydrate fermentation:					
Glucose	+	+	NA	NA	NA
Lactose	+	+	NA	NA	NA
Mannitol	+	+	NA	NA	NA
Sorbitol	+	+	NA	NA	NA
Arabinose	+	+	NA	NA	NA
Trehalose	+	+	NA	NA	NA
Xilose	+	+	NA	NA	NA
Galactose	+	+	NA	NA	NA
Maltose	+	+	NA	NA	NA
Temperature:					
4°C	-	-	NA	NA	NA
15°C	+	+	NA	NA	NA
25°C	+	+	NA	NA	NA
30°C	+	+	NA	NA	NA
35°C	+	+	NA	NA	NA
45°C	+	+	NA	NA	NA

Table 3. Extracellular enzyme production (protease, amylase, and cellulase) by strains. (-) negative; (+) positive.

Hydrolysis test	Morphotype	
	BS1-A	BS1-B
Protease	+	+
Amylase	-	-
Cellulase	+	+

100% sequence identity to homologs reported in other *Bacillus* species deposited in NCBI.

We compared *B. safensis* BS1-A with 36 *B. safensis* strains retrieved from the NCBI database and used them to construct a pangenome model. The core genes were used to construct a maximum-likelihood phylogenetic tree, which showed that *B. safensis* BS1-A clustered separately from the other strains but was closely related to *B. safensis* strain FUA2117 (Fig. 3) and revealed a group of unique genes annotated as hypothetical proteins. Within the accessory genes *B. safensis* BS1-A shared with *B. safensis* FUA2117, there is an

interesting cluster of genes involved in cell wall reshaping, such as *lytB* and *lytC_3* (Baidya et al. 2020)

Shrimp performance

Significant differences among the treatments ($P < 0.05$) were observed in growth parameters and FCR at the end of the experimental period (Table 6). Specifically, the BAC treatment exhibited higher final weight ($F_{2,9} = 6.22$, $P = 0.02$, $\eta^2 = 0.61$), WG ($F_{2,9} = 6.26$, $P = 0.02$, $\eta^2 = 0.61$), and SGR ($F_{2,9} = 6.80$, $P = 0.01$, $\eta^2 = 0.63$) than the control treatment, but no significant difference compared to the COM treatment. The FCR was significantly lower in BAC treatment with respect to control ($F_{2,9} = 5.44$, $P = 0.03$, $\eta^2 = 0.58$). All treatments showed similar survival rates (93-96%). In terms of water quality parameters (Fig. 4), TAN, nitrite, nitrate, phosphate, and TSS increased significantly over time ($P < 0.001$). Regarding the treatment effect, only TAN ($F_{2,36} = 8.85$, $P < 0.001$, $\eta^2 = 0.33$) and TSS ($F_{2,36} = 26.2$, $P < 0.001$, $\eta^2 = 0.59$) exhibited significant differences among treatments. The interaction between time and treatment also had a significant effect on TAN

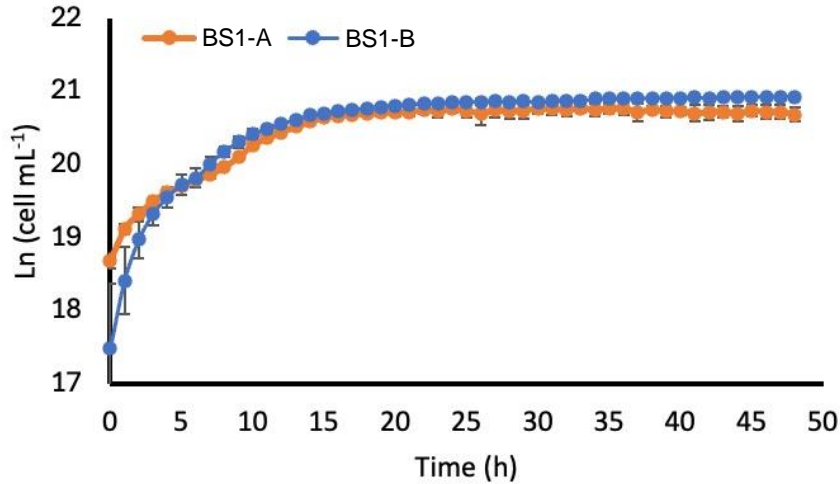


Figure 1. Typical growth curve for *Bacillus safensis* strains on tryptic soy broth+2.5NaCl. Bars indicate standard deviation for three independent experiments (n = 3).

Table 4. Antagonistic activity of *Bacillus safensis* morphotypes BS1-A and BS1-B to three *Vibrio* pathogenic bacteria. sd: standard deviation.

<i>Bacillus safensis</i>	Inhibition zone diameter (mean ± SD) (mm)		
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. diabolicus</i>	<i>V. harveyi</i>
1. BS1-A	22.3 ± 0.8	22.7 ± 0.6	24.23 ± 0.6
2. BS1-B		16.5 ± 0.5	4.3 ± 0.6
Control chloramphenicol 30 µg	20.3 ± 0.7	19.3 ± 0.6	20.7 ± 1.1

($F_{2,36} = 2.29$, $P = 0.033$, $\eta^2 = 0.39$), with concentrations in week six being significantly higher in the control treatment ($1.2 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$) compared with BAC ($0.8 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$) and COM ($0.75 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$). Similarly, TSS showed a significant effect ($F_{2,36} = 3.92$, $P < 0.001$, $\eta^2 = 0.52$), with values more than 35% higher in the control treatment during week 6 compared with BAC and COM (Fig. 4).

DISCUSSION

Biochemical tests provide a rapid, straightforward method for preliminary identification of bacteria based on the presence or absence of specific enzymes. They also allow determination of their metabolic and physiological properties, enabling them to metabolize different substrates. Both *B. safensis* morphotypes tested positive for ornithine. They fermented the carbon sources examined in this study, demonstrating their ability to degrade and metabolize various sugars for carbon and energy. These results contrast with those of Singh et al. (2013), who reported no reaction with mannitol or galactose.

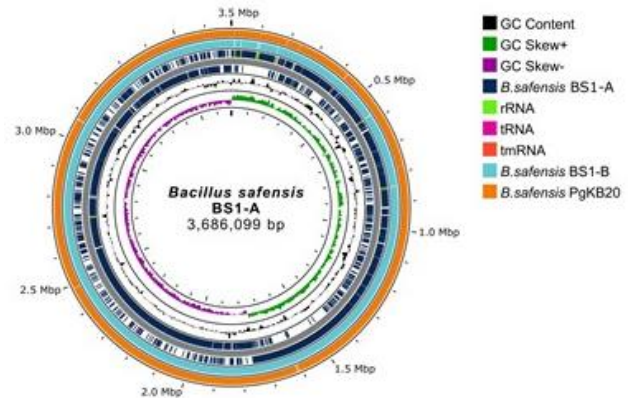


Figure 2. Genome of *Bacillus safensis* BS1-A Circular representation of the BS1-A genome. From the outside to the center: BLAST comparison with *B. safensis* PgK20 and BS1-B sequences; coding genes of BS1-A; genomic G+C content; and genome GC skew value distribution.

During the phenotypic characterization of *B. safensis*, two colonial morphotypes (BS1-A and BS1-B) were observed in the same isolate, suggesting intra-strain phenotypic variation. This phenomenon has been

Table 5. Sequencing and assembly statistics of the bacterial genome, including read quality metrics and genome assembly parameters (genome size, coverage, number of annotated genes, rN50, and rNG50).

Metric		Value				
Total bp sequenced		382,148,349 bp				
Total number of reads		157,576 reads				
Longest read		33,518 bp				
Assembly stats						
Contig(s)	Length	Genome size	Coverage	Number of genes annotated	rN50	rNG50
Genome	3686099 bp	3.69 Mb	98.13x	3781 genes	3651 bp	17,267 bp

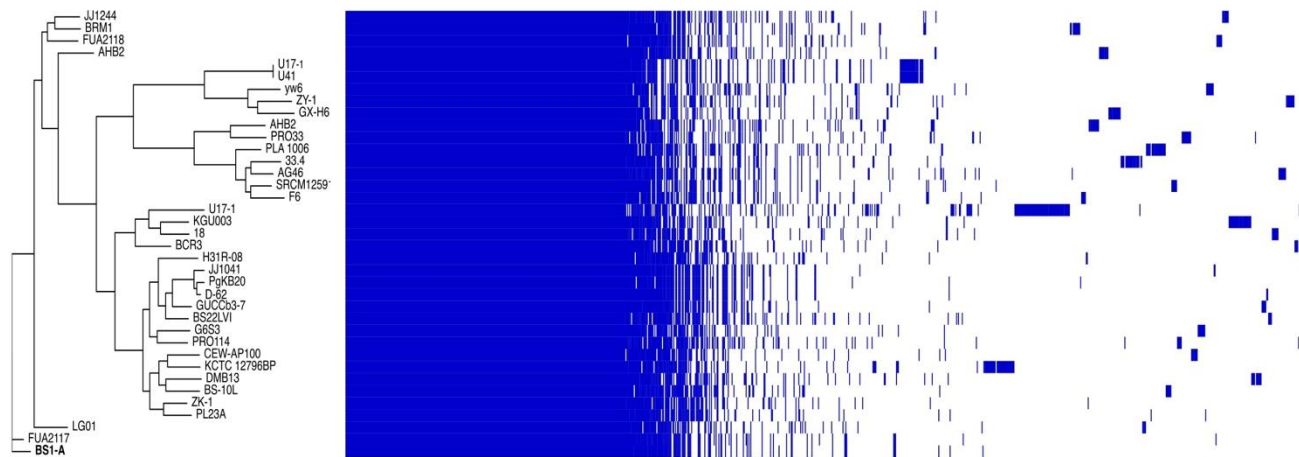


Figure 3. Pangenome analysis for 38 *Bacillus safensis* genomes. The phylogenetic tree on the left was constructed in RaxML using the maximum likelihood method, and the core gene alignment was obtained from Roary. The pangenome distribution is visualized in a heatmap where the rows correspond to the strains in the phylogenetic tree, and the columns represent specific orthologous groups. Genetic presence is indicated in blue, and absence is shown in white.

widely documented in the genus *Bacillus*, where a single bacterial lineage may give rise to distinct colonial morphotypes as a result of phase variation, phenotypic plasticity, or regulatory changes, without necessarily implying taxonomic differences (Di Franco et al. 2002, Arnaouteli et al. 2021).

In model species such as *B. subtilis*, colony morphology is closely associated with extracellular matrix production and biofilm formation, processes regulated by complex genetic networks in which the master regulator SinR plays a key role. Alterations in the activity of this regulator can generate colonies with contrasting phenotypes, such as smooth or wrinkled morphotypes, which represent differentiated adaptive strategies within the same bacterial population (Leiman et al. 2014, Richter et al. 2018). Recent studies have shown that these morphotypes may coexist as functional subpopulations, differing in physiological

traits, extracellular enzyme production, and competitive abilities (Arnaouteli et al. 2021).

Furthermore, reversible transitions between colonial morphotypes, such as opaque and translucent colonies, have been reported in different species of the genus *Bacillus*, and are associated with variations in gene expression and ecologically relevant properties (Diabankana et al. 2022). In *B. mycoides*, drastic changes in colony morphology have been described as resulting from modifications in growth and cellular organization, even when strains share the same genetic background (Di Franco et al. 2002).

In *B. safensis*, colony morphology has generally been described as white, round colonies with undulate margins; however, the emergence of morphological variants within the same isolate is consistent with the genus's phenotypic plasticity (Satomi et al. 2006). Therefore, the presence of morphotypes BS1-A and

Table 6. Zootechnical parameters of growth, food consumption, and survival for *P. vannamei* shrimp after 42 days with low water exchange and application of experimental (BAC) and commercial (COM) probiotic bacteria. The values in the table represent the replicate means \pm standard error. Different letters denote significant differences ($P < 0.05$) among treatments, as determined by Tukey's test. WG: weight gain; SGR: specific growth rate; FCA: feed conversion ratio; S: survival.

Treatments	FW (g)	WG (%)	SGR (% d ⁻¹)	FCA	S (%)
Control	4.99 \pm 0.05 ^a	898 \pm 10 ^a	5.48 \pm 0.02 ^a	1.48 \pm 0.02 ^b	96 \pm 3
BAC	5.49 \pm 0.17 ^b	998 \pm 30 ^b	5.70 \pm 0.07 ^b	1.40 \pm 0.0 ^a	96 \pm 3
COM	5.42 \pm 0.1 ^{ab}	978 \pm 23 ^{ab}	5.66 \pm 0.05 ^{ab}	1.42 \pm 0.0 ^{ab}	93 \pm 4

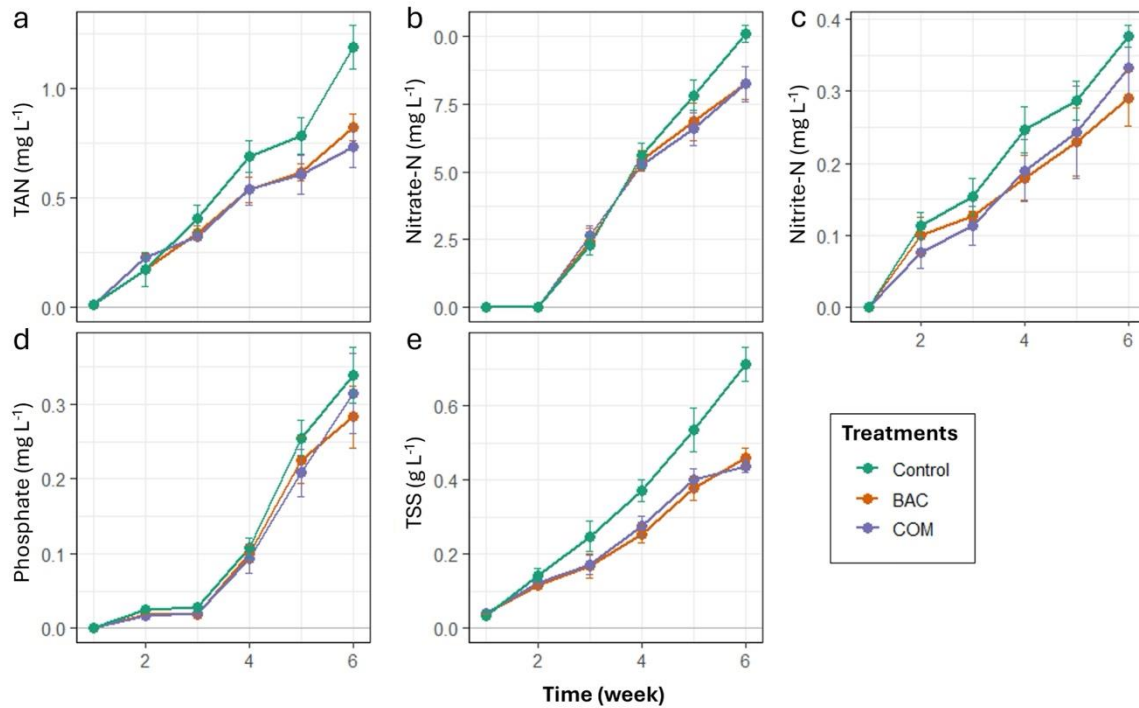


Figure 4. Temporal variation of water quality parameters during the experimental period under different treatments. Mean (\pm standard error) values of a) total ammonia nitrogen (TAN), b) nitrate (NO₃-N), c) nitrite (NO₂⁻-N), d) phosphate (PO₄³⁻), and e) suspended solids (SS) measured weekly in tanks subjected to different treatments: control, mix of equal parts of BS1-A and BS1-B (BAC), and commercial probiotic (COM).

BS1-B may partially explain differences observed in certain biochemical and physiological tests, reinforcing the idea that intraspecific variability is a common feature of bacteria in the genus *Bacillus* (Sitdhapol et al. 2012).

The temperature growth range of 15-45°C observed in this study suggests that *B. safensis* BS1-A and BS1-B are mesophilic bacteria abundant in nature; however, this differs from other reports, which indicate a range of 25-42°C for these bacteria (Satomi et al. 2006, Singh et al. 2013). The tolerance to salinity presented by the

B. safensis BS1-A and BS1-B coincides with that reported by Satomi et al. (2006), who described growth at 0-10% NaCl for a strain of *B. safensis*, and Sánchez-Ortiz et al. (2015), who reported a tolerance to NaCl of 9-12% for a strain of the genus *B. subtilis*. Recent studies have shown that this bacterium exhibits high salinity tolerance, even when 16% NaCl is used in culture. In probiotic strains, tolerance to a wide range of salinities is desirable, given the environments the strain must face before reaching the host. Both morphotypes were oxidase negative, suggesting that

they may be facultative anaerobic and do not require oxygen to colonize specific tissues or organs, an expected property of a probiotic strain, coinciding with what was described by Álvarez-López et al. (2014), who explained that the genus *Bacillus* presents species with positive or negative oxidase reaction. The two morphotypes presented an adverse reaction to the indole and motility test, so it can be inferred that they do not present the tryptophanase enzyme that allows for the hydrolysis of tryptophan and that do not present structures for locomotion, such as flagella or cilia, respectively, coinciding with previous reports (Álvarez-López et al. 2014, Lateef et al. 2015). Several authors have reported that biochemical characteristics may vary even within the same species (Raja & Omine 2012). Variations in biochemical activity between morphotypes of the same strain, as those observed in BS1-A and BS1-B. Similar observations were made by Jiménez et al. (2008), who compared the biochemical characterization of *B. licheniformis* strains and noted differences despite their shared species classification. In the case of qualitative determination of enzymes, *B. safensis* morphotypes BS1-A and BS1-B tested positive for protease and cellulase enzyme production but not for amylase enzymes, which has also been reported by other authors who also observed no amylase activity in *B. safensis* strains (Satomi et al. 2006, Singh et al. 2013), which coincides with our findings. On the other hand, the production of the enzymes protease and cellulase by both morphotypes allows the release of amino acids and the availability of simple sugars and energy, respectively, allowing the microorganisms to use them directly and efficiently, results that coincide with those reported by Álvarez-López et al. (2014), Lateef et al. (2015) and Andreani et al. (2017). In addition, authors such as Dat et al. (2019) reported that the presence of protease and cellulase enzymes in a strain of *Bacillus* sp. improved water quality in aquaculture.

The morphotypes BSA-1 and BSA-2 of *B. safensis* demonstrated the ability to inhibit the three tested pathogenic *Vibrio* species, which is consistent with the study conducted by Huynh-Phuoc et al. (2022), who found that *B. safensis* VQV1 and VQV8 inhibited the growth of four *Vibrios*. Similarly, a study by Rodrigues e Silva et al. (2018) found that *B. safensis* SG-32 inhibited the growth of 20 of 26 bacterial isolates (excluding *Vibrio* spp.) from the same oil reservoir. These results demonstrate the antagonistic activity of *B. safensis* against various *Vibrio* species and its potential to prevent disease in aquatic systems. In recent studies, *B. safensis* has been recognized as an important species

for scientific and industrial studies (Huynh-Phuoc et al. 2022). However, to date, no reports of inhibition of pathogenic *Vibrio* in this species have been published. Therefore, the morphotypes used in this study have shown strong potential to inhibit pathogenic *Vibrio* bacteria. As mentioned in the results section, they might even inhibit antibiotic-resistant *V. diabolicus*.

The bacteriophage genes identified in the *B. safensis* genome are present in many *B. safensis* strains. This phage sequence is homologous to the *Brevibacillus* phage, Jimmer 1 (Tirumalai et al. 2018). In addition, the *cat86* gene encodes a chloramphenicol acetyltransferase (CAT), an enzyme that confers resistance to chloramphenicol and other phenicol antibiotics through acetylation-mediated inactivation. This resistance mechanism has been extensively documented in members of the genus *Bacillus*, where *cat*-type genes may be either constitutively expressed or inducible, depending on their regulatory architecture (Mongkolsuk et al. 1984, Duvall et al. 1985). The detection of *cat86-1* in *B. safensis*, showing 90-100% sequence identity with homologous genes reported in other *Bacillus* spp. deposited in the NCBI database, is consistent with previous genomic studies describing chloramphenicol resistance determinants in environmental and industrial *Bacillus* strains (CARD ARO:3002672). Although high sequence identity suggests conservation of *cat86-1* within the *Bacillus* lineage, sequence similarity alone does not provide sufficient evidence regarding the evolutionary origin or mobility of the resistance determinant. For strains proposed for application in aquaculture as probiotics or biocontrol agents, it is essential to determine whether *cat86-1* represents an intrinsic chromosomal feature or an acquired gene associated with mobile genetic elements, such as plasmids, transposons, or integrative conjugative elements. This distinction is particularly relevant in aquatic environments, where microbial communities are highly dynamic and horizontal gene transfer may be enhanced by selective pressures (Baidya et al. 2020). *B. safensis* and closely related *Bacillus* species have been increasingly investigated for their antagonistic activity against *Vibrio* spp., owing to their capacity to produce antimicrobial compounds and to compete effectively within aquatic microbial communities. However, the presence of antibiotic resistance genes in candidate probiotic strains raises biosafety concerns, as these bacteria may serve as reservoirs or vectors for the dissemination of resistance in aquaculture systems (FAO/WHO 2002). Accordingly, international guidelines for probiotic evaluation emphasize that strains intended for use in food or feed

applications should not harbor transferable antibiotic resistance genes (FAO/WHO 2002, EFSA 2023). Recent genome-based studies have reported the presence of *cat86* in *B. safensis* strains isolated from diverse environments, suggesting that this gene may constitute part of the species' or closely related taxa' accessory genome (Bezuidenhout et al. 2025, Kamilari et al. 2025). Nevertheless, in silico detection alone does not necessarily correlate with phenotypic resistance. Therefore, complementary analyses-such as minimum inhibitory concentration (MIC) assays for chloramphenicol, gene expression analysis, and detailed examination of the genomic context of *cat86-1* are required to assess its functional relevance and potential risk.

Overall, the identification of *cat86-1* in *B. safensis* BS1-A highlights the importance of incorporating comprehensive genomic safety screening into the evaluation of beneficial bacteria intended for aquaculture applications. While this finding does not automatically preclude the use of BS1-A as a biocontrol or probiotic candidate against *Vibrio* spp., it underscores the need for a balanced risk assessment that integrates antimicrobial efficacy with considerations of antibiotic resistance and environmental safety. The presence of bacillibactin and bacilysin gene clusters in both morphotypes is important because their gene products have the potential to serve as sources of antibacterial compounds (Chakraborty et al. 2022, Islam et al. 2022).

B. safensis tolerates a broad spectrum of habitats due to its genotypic and, therefore, physiological capacities (Lateef et al. 2015). One is related to its ability to tolerate high salt concentrations (Atif et al. 2023). However, the best growth results are obtained with concentrations below 5% NaCl. In this work, NaCl was added to the culture medium at a concentration of 2.5%, ensuring growth results comparable to those at the start of the bacterial growth kinetics to those reported by Huynh-Phuoc et al. (2022), whose cultures reached the exponential phase at 4 h. Still, unlike the study above, BS1-A and BS1-B reach their maximum growth at 18 h, while those reported by Huynh-Phuoc, even at 24 h, have not yet achieved the stationary phase, indicating a faster growth capacity for *B. safensis* in trypticase soy broth than that for marine broth used in the work of Huynh-Phuoc.

Regarding the potential benefits of *B. safensis* in shrimp culture, the application of this bacterium as a probiotic in the culture water improved shrimp growth and feed conversion ratio compared to the control (without bacterial application) and did not differ

significantly from a commercial probiotic (COM). Several *Bacillus* species are classified as probiotics in aquaculture, with demonstrated benefits including growth promotion and immune and disease resistance in various aquatic species, such as white shrimp (Nayak 2021). The application of a 1:1 mixture of two strains of *Bacillus subtilis* at 10^5 and 10^8 CFU mL⁻¹ in the *P. vannamei* shrimp culture water resulted in improved growth rate and FCR compared to the untreated control (Zokaefar et al. 2014). The use of *B. subtilis* in feed has also been described to improve *P. vannamei* growth and FCR compared to a control feed (Olmos et al. 2011). These observable benefits could be partly attributed to the improvement in enzymatic digestive activities and beneficial gut microbiota (Zokaefar et al. 2014, Olmos et al. 2020). On the flip side, sometimes probiotics may not directly impact shrimp growth, but they do improve physiological parameters and water quality (Ferreira et al. 2015, Llarío et al. 2019).

On the other hand, to the best of our knowledge, there is no previous study on the use of *B. safensis* as a probiotic in *P. vannamei*. Nevertheless, in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), the application of *B. safensis* (NPUST1) in feed (10^5 to 10^7 CFU g⁻¹ for eight weeks) improved growth, innate immunity, and resistance against *Streptococcus iniae* (Wu et al. 2021). Regarding water quality, both *B. safensis* morphotypes reduced total ammonia nitrogen compared to the control treatment. This property has previously been reported for *B. safensis* in domestic wastewater (Kim et al. 2021). Moreover, the capacity of *B. safensis* to ferment various carbon sources may be associated with the lower total sedimentable solids observed in treatment BAC compared to the control. Different *Bacillus* species have been reported to promote ammonia denitrification and remove organic carbon from shrimp wastewater, while also contributing to pathogen control (Boopathy et al. 2015, Sampath et al. 2025). These results suggest that *B. safensis* may play a dual role in improving water quality and maintaining a more stable microbial environment, thereby supporting better culture performance and system sustainability.

CONCLUSIONS

This study identifies *B. safensis* as a potential probiotic for shrimp culture water, improving feed utilization as evidenced by a reduced FCR. The two morphotypes, BS1-A and BS1-B, shared core physiological and biochemical traits but exhibited intra-species variability in citrate utilization and salinity tolerance, indicating metabolic versatility under aquaculture

conditions. Both morphotypes produced protease and cellulase enzymes, suggesting a role in nutrient digestion and absorption that may enhance shrimp growth. Genomic analyses confirmed the identity of *B. safensis*. They revealed gene clusters associated with secondary metabolite biosynthesis and accessory genes involved in cell wall remodeling, which may support environmental adaptation. Although a prophage region and the cat86-1 gene were detected, further evaluation is required to assess their functional and biosafety implications. Overall, these results support the potential application of *B. safensis* in shrimp aquaculture; however, additional studies are needed to elucidate its physiological effects, including its effects on digestive enzyme activity and modulation of the microbiota.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Biomarina Reproductiva S. de R.L. de C.V. and Víctor Alvarez for kindly donating the shrimp juveniles. MALV thanks SECIHTI for the support through grant number 853824. We are also grateful to Julissa Enciso-Ibarra for sample sequencing, and to Sandra de la Paz-Reyes and Gabriel Robles-Villegas from the Laboratory of Aquaculture Nutrition, Sindi Areli Juan-Antúnez from the Chemical Analysis Laboratory, and Microbiology and Biotechnology for the Agro-Aquaculture and Multitrophic Integration Laboratory.

Credit author contribution

M.A. Liñan-Vidriales: conceptualization, validation, methodology, formal analysis and writing-original draft; E. Quiroz-Guzmán: funding acquisition, project administration, supervision, review and editing; A. Peña-Rodríguez: funding acquisition, project administration, supervision, review and editing; N.A. Ochoa-Álvarez & J.M. Ramírez-Orozco: methodology, validation, supervision, review and editing; I. Ramírez-Sánchez: methodology, data curation, formal analysis, review and editing; L. Rojo-Arreola: methodology, formal analysis, review and editing

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

Abdel-Tawwab, M., Khalil, R.H., Nour, A.M., et al. 2022. Effects of *Bacillus subtilis*-fermented rice bran on water quality, performance, antioxidants/oxidants, and

immunity biomarkers of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared at different salinities with zero water exchange. *Journal of Applied Aquaculture*, 34: 332-357. doi: 10.1080/10454438.2020.1844110

Abdelli, F., Jardak, M., Elloumi, J., et al. 2019. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain, *Bacillus safensis* f4. *Biodegradation*, 30: 287-300. doi: 10.1007/s10532-018-09865-4

Alcock, B.P., William-Huynh, R.C., Keaton, W., et al. 2023. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51: 690-699. doi: 10.1093/nar/gkac920

Álvarez-López, C., Osorio, V.W., Diez, G.M.C., et al. 2014. Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*, 25: 226-241. doi: 10.15517/am.v25i2.15426

Andreani, N.A. & Fasolato, L. 2017. *Pseudomonas* and related genera. In: *The microbiological quality of food*. Woodhead Publishing, Swaston, pp. 25-59. doi: 10.1016/B978-0-08-100502-6.00005-4

Arnaouteli, S., Bamford, N.C., Stanley-Wall, N.R., et al. 2021. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19: 600-614. doi: 10.1038/s41579-021-00540-9

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. *Official methods of analysis*. AOAC, Arlington.

Atif, A.M., Elzamik, F.I., Mohamed, G.M., et al. 2023. Biological control of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on eggplants with various chitinase-producing *Streptomyces* strains. *European Journal of Plant Pathology*, 167: 371-394. doi: 10.1007/s10658-023-02718-8

Baidya, A.K., Rosenshine, I. & Ben-Yehuda, S. 2020. Donor-delivered cell wall hydrolases facilitate nanotube penetration into recipient bacteria. *Nature Communications*, 11: 1938.

Bezuidenhout, C.C., Molale-Tom, L.G., Kritzinger, R.K., et al. 2025. Draft genome sequence of *Bacillus safensis* 2T-2, isolated from drinking water. *Data Brief*, 9: 111870. doi: 10.1016/j.dib.2025.111870

Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H.E., et al. 2023. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures, and visualization. *Nucleic Acids Research*, 51: 46-50. doi: 10.1093/nar/gkad344

- Boopathy, R., Kern, C. & Corbin, A. 2015. Use of *Bacillus* consortium in waste digestion and pathogen control in shrimp aquaculture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102: 159-164. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.02.001
- Bortolaia, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., et al. 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75: 3491-3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M. & Gabaldón, T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25: 1972-1973. doi: 10.1093/bioinformatics/btp348
- Chakraborty, K., Kizhakkekalam, V.K., Joy, M., et al. 2022. Bacillibactin class of siderophore antibiotics from a marine symbiotic *Bacillus* as promising antibacterial agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106: 329-340. doi: 10.1007/s00253-021-11632-0
- Chen, Y., Chiu, W.C., Wang, T.Y., et al. 2024. Isolation and characterization of an antimicrobial *Bacillus* sp. showing antagonistic activity (disc diffusion). *Plos One*, 19: 0299015. doi: 10.1371/journal.pone.0299015
- Clausen, P.T.L.C., Aarestrup, F.M. & Lund, O. 2018. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, 19: 307. doi: 10.1186/s12859-018-2336-6
- Dat, T.T.H., Tam, V.T.T., Dung, T.T.K., et al. 2019. Isolation and screening of cellulose and organic matter degrading bacteria from aquaculture ponds for improving water quality in aquaculture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 266: 012002. doi: 10.1088/1755-1315/266/1/012002
- de Melo-Pereira, G.V., de Oliveira-Coelho, B., Magalhães-Júnior, A.I., et al. 2018. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36: 2060-2076. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.09.003
- Di Franco, C., Beccari, E., Santini, T., et al. 2002. Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiology*, 2: 33. doi: 10.1186/1471-2180-2-33
- Diabankana, R.G.C., Validov, S.Z., Vyshtakalyuk, A.B., et al. 2022. Effects of phenotypic variation on biological properties of endophytic bacteria *Bacillus Mojavensis* PS17. *Biology*, 11: 1305. doi: 10.3390/biology11091305
- Díaz, R., Gamazo, C. & López-Goñi, I. 1995. Manual práctico de Microbiología. Editorial Masson, S.A. Barcelona.
- Duvall, E.J., Williams, D.M. & Lovett, P.S. 1985. Chloramphenicol-inducible gene expression in *Bacillus*: regulation of the cat-86 gene. *Journal of Bacteriology*, 161: 665-672.
- Ebeling, M.E. 1968. The Dumas method for nitrogen in feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 51: 766-770. doi: 10.1093/jaoac/51.4.766
- European Food Safety Authority (EFSA). 2023. Qualified Presumption of Safety (QPS): risk assessment approach for microorganisms. *EFSA Journal*, Parma.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/WHO, Rome.
- Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., et al. 2021. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific Reports*, 11: 12728. doi: 10.1038/s41598-021-91456-0
- Ferreira, G.S., Bolivar, N.C., Pereira, S.A., et al. 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 448: 273-279. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.006
- Galicia-Nicolás, E.C., Aguilar-Ramírez, R.N. & Rico-Virgen, E.G. 2018. Colonization and succession of marine organisms involved in the biofouling process in submerged panels in La Paz, Baja California Sur, Mexico. *Universidad de Colima, Colima*, pp. 25-42.
- Grant, J.R., Enns, E., Marinier, E., et al. 2023. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51: W484-W492. doi: 10.1093/nar/gkad326
- Guo, J., Bolduc, B., Zayed, A.A., et al. 2021. VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome*, 9: 37. doi: 10.1186/s40168-020-00990-y
- Hadfield, J., Croucher, N.J., Goater, R.J., et al. 2017. Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics*, 34: 292-293. doi: 10.1093/bioinformatics/btx610
- Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Wang, A.R., et al. 2018. Probiotics as means of disease control in aquaculture: a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2429. doi: 10.3389/fmicb.2018.02429
- Huynh-Phuoc, V., Ly, T.Q., Purbiantoro, W., et al. 2022. *Bacillus safensis* isolated from white-leg shrimp, *Penaeus vannamei*, in Taiwan, with antagonistic activity against common *Vibrio* pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 44: 102477. doi: 10.1016/j.cbab.2022.102477

- Islam, T., Rabbee, M.F., Choi, J., et al. 2022. Biosynthesis, molecular regulation, and application of bacilysin produced by *Bacillus* species. *Metabolites*, 12: 397. doi: 10.3390/metabo12050397
- Jain, C., Rodriguez, R.L.M., Phillippy, A.M., et al. 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9: 5114. doi: 10.1038/s41467-018-07641-9
- Jiménez, M.V., Martínez-Benítez, M.S., García-Gil de Muñoz, F.L., et al. 2008. Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, 7: 51-60.
- Kaktcham, P.M., Temgoua, J.B., Zambou, F.N., et al. 2018. *In vitro* evaluation of the probiotic and safety properties of bacteriocinogenic and non-bacteriocinogenic lactic acid bacteria from the intestines of Nile tilapia and common carp for their use as probiotics in aquaculture. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10: 98-109. doi: 10.1007/s 12602-017-9312-8
- Kamilari, E., O'Connor, P.M., Farias, F.M.D., et al. 2025. *Bacillus safensis* APC 4099 has broad-spectrum antimicrobial activity against both bacteria and fungi and produces several antimicrobial peptides, including the novel circular bacteriocin safencin E. *Applied and Environmental Microbiology*, 91: e01942-24. doi: 10.1128/aem.01942-24
- Kang, M., Su, X., Yun, L., et al. 2022. Evaluation of probiotic characteristics and whole genome analysis of *Bacillus velezensis* R-71003 isolated from the intestine of common carp (*Cyprinus carpio* L.) for its use as a probiotic in aquaculture. *Aquaculture Reports*, 25: 101254. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101254
- Kapse, N.G., Engineer, A.S., Gowdaman, V., et al. 2019. Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of *Bacillus coagulans* HS243. *Genomics*, 111: 921-929. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.05.022
- Kavitha, M., Raja, M. & Perumal, P. 2018. Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquaculture Reports*, 11: 59-69. doi: 10.1016/j.aqrep.2018.07.001
- Kewcharoen, W. & Srisapoom, P. 2019. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish & Shellfish Immunology*, 94: 175-189. doi: 10.1016/j.fsi.2019.09.013
- Kim, K., Jung, J.Y. & Kwon, J.H. 2021. Potential of bacterial strains isolated from coastal water for wastewater treatment and as aqua-feed additives. *Microorganisms*, 9: 2441. doi: 10.3390/microorganisms 9122441
- Kothari, V.V., Kothari, R.K., Kothari, C.R., et al. 2013. Genomic sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain VK, isolated from saline desert area of Gujarat, India. *Genome A*, 1: e00671-13. doi: 10.1128/genomea.00671-13
- Lateef, A., Adelere, I.A. & Gueguim-Kana, E.B. 2015. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia*, 70: 411-419. doi: 10.1515/biolog-2015-0062
- Leiman, S.A., Arboleda, L.C., Spina, J.S., et al. 2014. SinR is a mutational target for fine-tuning biofilm formation in laboratory-evolved strains of *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiology*, 14: 301. doi: 10.1186/s 12866-014-0301-8
- Limbu, S.M., Chen, L.Q., Zhang, M.L., et al. 2021. A global analysis on the systemic effects of antibiotics in cultured fish and their potential human health risk: a review. *Reviews in Aquaculture*, 13: 1015-1059. doi: 10.1111/raq.12511
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., et al. 2018. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47: 687-692. doi: 10.1093/nar/gky1080
- Llario, F., Falco, S., Sebastiá-Frasquet, M.T., et al. 2019. The role of *Bacillus amyloliquefaciens* on *Litopenaeus vannamei* during the maturation of a biofloc system. *Journal of Marine Science and Engineering*, 7: 228. doi: 10.3390/jmse7070228
- Mac Faddin, J.F. 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Magray, A.R., Ganai, B.A. & Ahmad, F. 2020. Isolation, identification and pathogenicity patterns of *Mucor hiemalis* in cultured *Cyprinus carpio communis* using challenged system. *Aquaculture*, 518: 734837. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734837
- Mongkolsuk, S., Ambulos, N.P. & Lovett, P.S. 1984. Chloramphenicol-inducible gene expression in *Bacillus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81: 3834-3838. doi: 10.1128/jb.160.1.1-8.1984
- Monier, M.N., Kabary, H., Elfeky, A., et al. 2023. The effects of *Bacillus* species probiotics (*Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*) on the water quality, immune responses, and resistance of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Fusarium solani*

- infection. *Aquaculture International*, 31: 3437-3455. doi: 10.1007/s10499-023-01136-1
- Nayak, S.K. 2021. Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. *Reviews in Aquaculture*, 13: 862-906. doi: 10.1111/raq.12503
- Nicholson, W.L. 2004. Ubiquity, longevity, and ecological roles of *Bacillus* spores. In: Ricca, E., Henriques, A.O. & Cutting, S.M. (Eds.). *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications*. Horizons Bioscience. Norfolk, pp. 1-15.
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., et al. 2020. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of Microbiology*, 202: 427-435. doi: 10.1007/s00203-019-01757-2
- Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J., et al. 2011. Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* probiotic strains. *Marine Drugs*, 9: 1119-1132. doi: 10.3390/md9061119
- Page, A.J., Cummins, C.A., Hunt, M., et al. 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31: 3691-3693. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421
- Raja, C.E. & Omine, K. 2012. Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil. *African Journal of Biotechnology*, 11: 2267-2275. doi: 10.5897/AJB11.3131
- Reda, R.M., Selim, K.M., El-Sayed H.M., et al. 2018. *In vitro* selection and identification of potential probiotics isolated from the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10: 692-703. doi: 10.1007/s12602-017-9314-6
- Rekik, H., Jaouadi, N.Z., Gargouri, F., et al. 2019. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121: 1227-1239. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.139
- Richter, A., Hölscher, T. & Kovács, Á.T. 2018. Hampered motility promotes the evolution of wrinkly phenotype in *Bacillus subtilis*. *BMC Evolutionary Biology*, 18: 155. doi: 10.1186/s12862-018-1266-2
- Ringo, E., Hoseinifar, S.H., Ghosh, K., et al. 2018. Lactic acid bacteria in finfish-an update. *Frontiers in Microbiology*, 2018: 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01818
- Rodrigues e Silva, T., dos Santos-Neto, E.V., Gois-Ruis, A.L.T., et al. 2018. Antimicrobial, antiparasitic and antiproliferative effects of the extract of *Bacillus safensis* SG-32 isolated from a Brazilian oil reservoir. *African Journal of Microbiology Research*, 12: 897-907. doi: 10.5897/ajmr2018.8940
- Rohani, M.F., Islam, S.M., Hossain, M.K., et al. 2022. Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 120: 569-589. doi: 10.1016/j.fsi.2021.12.037
- Rodrigues e Silva, T., dos Santos-Neto, E.V., Gois-Ruis, A.L.T., et al. 2018. Antimicrobial, antiparasitic and antiproliferative effects of the extract of *Bacillus safensis* SG-32 isolated from a Brazilian oil reservoir. *African Journal of Microbiology Research*, 12: 897-907. doi: 10.5897/ajmr2018.8940
- Sampath, H., Veerasamy, G. & Mukkalil, R. 2025. Harnessing *Bacillus* probiotics: an approach for *Vibrio* pathogen control and organic sludge management in shrimp aquaculture. *Aquaculture Research*, 1: 2767593. doi: 10.1155/are/2767593
- Sánchez-Ortiz, A.C., Luna-González, A., Campa-Córdova, Á.I., et al. 2015. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43: 123-136. doi: 10.3856/vol43-issue1-fulltext-11
- Satomi, M., La Duc, M.T. & Venkateswaran, K. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1735-1740. doi: 10.1099/ijs.0.64189-0
- Satomi, M., Myron, T., Duc, L., et al. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1735-1740. doi: 10.1099/ijs.0.64189-0
- Seemann, T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30: 2068-2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Singh, R.S., Singh, R.P. & Yadav, M. 2013. Molecular and biochemical characterization of a new endoinulinase producing bacterial strain of *Bacillus safensis* AS-08. *Biologia*, 68: 1028-1033. doi: 10.2478/s11756-013-0259-2

- Sitdhipol, J., Niwasabutra, K., Wannissorn, B., et al. 2012. Characterization of alkaline phosphatase producing bacteria isolated from Thai fermented fish products. *International Journal of Biology*, 4: 44-55. doi: 10.5539/ijb.v4n3p44
- Skinninger, M.A., Johnston, C.W., Gunabalasingam, M., et al. 2020. Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nature Communications*, 11: 6058. doi: 10.1038/s41467-020-19986-1
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30: 1312-1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033
- Thite, V.S., Nerurkar, A.S. & Baxi, N.N. 2020. Optimization of concurrent production of xylanolytic and pectinolytic enzymes by *Bacillus safensis* M35 and *Bacillus altitudinis* J208 using agro-industrial biomass through response surface methodology. *Scientific Reports*, 10: 3824. doi: 10.1038/s41598-020-60760-6
- Tirumalai, M.R., Stepanov, V.G., Wünsche, A., et al. 2018. *Bacillus safensis* FO-36b and *Bacillus pumilus* SAFR-032: A whole genome comparison of two spacecraft assembly facility isolates. *BMC Microbiology*, 18: 119. doi: 10.1186/s12866-018-1191-y
- van Heel, A.J., de Jong, A., Song, C., et al. 2018. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46: 278-281. doi: 10.1093/nar/gky383
- Vernikos, G.S. & Parkhill, J. 2006. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics*, 22: 2193-206. doi: 10.1093/bioinformatics/btl369
- Vinh, H.P., Thuyen, Q.L., Wahyu, P., et al. 2022. *Bacillus safensis* isolated from white-leg shrimp, *Penaeus vannamei* in Taiwan with antagonistic activity against common *Vibrio* pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 44: 102477. doi: 10.1016/j.bcab.2022.102477
- Viteri, F.P.A., Castillo, G.D.A. & Viteri, R.S.E. 2015. Development and evaluation of an inoculum of cellulolytic bacteria. *Revista UDCA-Actualidad and Divulgación Científica*, 18: 207-215.
- Wang, A.R., Ran, C., Wang, Y.B., et al. 2019. Use of probiotics in aquaculture of China: a review of the past decade. *Fish & Shellfish Immunology*, 86: 734-755. doi: 10.1016/j.fsi.2018.12.026
- Wenning, R. 2020. The state of world fisheries and aquaculture (Sofia) Report. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16: 800-801.
- Wishart, D.S., Han, S., Saha, S., et al. 2023. PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Research*, 51: W443-W450. doi: 10.1093/nar/gkad382
- Wu, P.S., Liu, C.H. & Hu, S.Y. 2021. Probiotic *Bacillus safensis* NPUST1 administration improves growth performance, gut microbiota, and innate immunity against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Microorganisms*, 9: 2494. doi: 10.3390/microorganisms9122494
- Xie, G., Zhu, Y., Zhong, Z., et al. 2023. Functional genomic characterization unveils probiotic features of *Bacillus cereus* G1-11 isolated from the gut of the hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂). *LWT - Food Science and Technology*, 184: 11508. doi: 10.1016/j.lwt.2023.115088
- Yang, J., Sun, Y., Lei, X., et al. 2023. Evaluation of novel isolates of *Lacticaseibacillus rhamnosus* Probio-M9 derived through space mutagenesis. *Food Bioscience*, 52: 102456. doi: 10.1016/j.fbio.2023.102456
- Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M.A.O., et al. 2022. Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: a review. *Aquaculture*, 547: 737514. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737514
- Zabidi, A., Yusoff, F.M., Amin, N., et al. 2021. Effects of probiotics on growth, survival, water quality and disease resistance of red hybrid tilapia (*Oreochromis* spp.) fingerlings in a biofloc system. *Animals*, 11: 3514. doi: 10.3390/ani11123514
- Zhang, Y.R., Wu, Z.C., Yu, M.N., et al. 2022. Evaluating the probiotic potential and adhesion characteristics of *Bacillus* spp. isolated from the intestine of *Rhynchocypris lagowskii* Dybowski. *Aquaculture International*, 30: 747-772. doi: 10.1007/s10499-022-00840-8
- Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C.R., et al. 2014. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 36: 68-74. doi: 10.1016/j.fsi.2013.10.007

Received: August 8, 2025; Accepted: March 19, 2026

Anexo B. Artículo sometido. Seaweed as a sustainable replacement for terrestrial plant ingredients in shrimp feed



Alberto Pena Rodriguez <apena@cibnor.mx>

Journal of Applied Phycology - Receipt of Manuscript 'Seaweed as a...'

1 mensaje

Springer Nature <do-not-reply@springernature.com>
Para: Dr Peña-Rodríguez <apena@cibnor.mx>

8 de enero de 2026 a las 12:43

Ref: Submission ID 3ff5292e-95da-4863-af19-c12649576f61

Dear Dr Peña-Rodríguez,

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Applied Phycology.

Your manuscript is now at our initial Technical Check stage, where we look for adherence to the journal's submission guidelines, including any relevant editorial and publishing policies. If there are any points that need to be addressed prior to progressing we will send you a detailed email. Otherwise, your manuscript will proceed into peer review.

You can check on the status of your submission at any time by using the link below and logging in with the account you created for this submission:

https://submission.springernature.com/submission-details/3ff5292e-95da-4863-af19-c12649576f61?utm_source=submissions&utm_medium=email&utm_campaign=confirmation-email&journal_id=10811

Kind regards,

Editorial Assistant
Journal of Applied Phycology

Journal of Applied Phycology is a hybrid journal. This means when the journal accepts research for publication, the article may be published using either immediate gold open access or the subscription publishing route. For further information please visit <https://www.springernature.com/gp/open-research/about/green-or-gold-routes-to-OA/hybrid-options>

1 **Seaweed as a sustainable replacement for terrestrial plant ingredients in shrimp feed**

2 María A. Liñan-Vidriales¹, Orcid 0000-0002-5652-2612

3 Eduardo Quiroz-Guzmán¹, Orcid 0000-0002-4776-4564

4 Martha Nieto-López², Orcid 0000-0002-1000-4406

5 Maribel Maldonado-Muñiz², Orcid 0000-0002-4108-0954

6 Alberto Peña-Rodríguez^{1*}, Orcid 0000-0002-7015-5361

7

8 ¹Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Instituto Politécnico
9 Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S., 23090, Mexico.

10 ²Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL),
11 Av. Universidad S/N, 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico.

12 *Corresponding author: Alberto Peña-Rodríguez, Tel: +52-612-123-8484 ext. 3331, email:
13 apena@cibnor.mx

14

15

16 **Author contributions**

17 Conceptualization: Alberto Peña-Rodríguez, María Liñan-Vidriales; Methodology: Alberto
18 Peña-Rodríguez, Martha Nieto-López; Formal analysis and investigation: Maribel
19 Maldonado-Muñiz, María Liñan-Vidriales, Eduardo Quiroz-Guzmán; Writing - original
20 draft preparation: María Liñan-Vidriales; Writing - review and editing: Alberto Peña-
21 Rodríguez, Martha Nieto-López, Maribel Maldonado-Muñiz; Supervision: Alberto Peña-
22 Rodríguez, Eduardo Quiroz-Guzmán

23

24 **Abstract**

25 This study evaluated three experimental diets for juvenile *Penaeus vannamei* during a six-
26 week feeding trial, with complete (Swd), partial (Mix), or no replacement (Ctr) of low-
27 protein terrestrial plant ingredients with a seaweed meal mix composed of equal parts of
28 *Macrocystis sp.*, *Sargassum sp.*, *Egregia sp.*, and *Ulva lactuca*. All dietary treatments were
29 evaluated in triplicate with an average initial shrimp weight of 1.25 ± 0.2 g under laboratory-
30 controlled conditions. Digestive enzyme activities (trypsin, chymotrypsin, lipase, and
31 amylase) were analyzed to evaluate digestive capacity and nutrient utilization in response to
32 dietary seaweed replacement. After the experimental period, survival exceeded 90% across
33 all treatments. Although the diet with the highest seaweed inclusion (28.4%, Swd) tended to
34 improve growth performance and feed conversion ratio (FCR), no statistically significant
35 differences were detected among treatments ($p > 0.05$). Lipase, trypsin and chymotrypsin
36 activities were similar among treatments; however, amylase activity increased significantly
37 ($p < 0.05$) in shrimp fed seaweed diets (Swd and Mix), suggesting enhanced utilization of
38 seaweed carbohydrates. Overall, the combination of different seaweed meals appears to
39 allow safe inclusion levels without compromising growth or digestive capacity. These results
40 support the potential use of seaweed mixtures as sustainable alternatives to terrestrial plant
41 ingredients in practical shrimp feeds.

42 **Keywords:** *Penaeus vannamei*; aquafeed formulation; growth performance; alternative
43 ingredients

44

45

46 **1. Introduction**

47 Shrimp aquaculture faces the dual challenge of maintaining profitability and reducing its
48 environmental footprint. Global penaeid shrimp aquaculture production was estimated at 7.9
49 million tonnes in 2022, with *Penaeus vannamei* accounting for 86% of the total (FAO 2024).
50 In recent decades, the rapid expansion of *P. vannamei* aquaculture has been accompanied by
51 an increased demand for balanced feeds, which may represent up to 60% of shrimp
52 production cost (Molina, 2009). Additionally, the growing dependence on terrestrial crops
53 for aquafeeds intensifies competition for arable land and freshwater resources and
54 contributes to the environmental footprint of the sector (Froehlich et al. 2018), reinforcing
55 the need for more sustainable feed ingredients.

56 One of the main factors influencing the nutritional performance of shrimp feed is the nutrient
57 content and composition of the diet (Tacon et al. 2013). Wheat flour and other plant
58 ingredients are included in the feed formula as binders and sources of digestible
59 energy (Nieto-López et al. 2011; Nunes et al. 2022). Nevertheless, agricultural land-use
60 expansion increases greenhouse gas emissions that could be mitigated by the substitution or
61 supplementation with farmed seaweed biomass grown in the ocean (Duarte et al. 2021;
62 Spillias et al. 2023). Their cultivation requires no freshwater, arable land, or external
63 fertilizers, making seaweed a resource-efficient biomass compared to conventional
64 terrestrial crops with high water footprint (Hoekstra and Chapagain, 2011). In addition,
65 seaweeds contribute to ecosystem services such as nutrient bioremediation and carbon
66 sequestration, further enhancing their value as sustainable feed ingredients (García-Poza et
67 al. 2022). Beyond their environmental advantages, seaweeds contain bioactive compounds,
68 including polysaccharides, essential minerals, phenolic compounds, pigments, and
69 nutritionally relevant protein fractions, supporting their nutritional and functional potential
70 for innovative aquafeeds. (Matos et al. 2024; Hernández-Sain et al. 2025). Seaweeds are
71 highly diverse and widely distributed worldwide, and in many regions, form natural blooms
72 that remain underexploited and may cause environmental problems, as reported for
73 *Sargassum sp.* in the Caribbean (Robledo et al. 2021) and *Ulva sp.* along the coasts of China
74 (Wang et al. 2018). Low inclusion levels of seaweed meals have been explored as
75 nutraceutical and functional ingredients in shrimp feed (Hernández-Sain et al. 2025). For
76 instance, the inclusion of *Ulva sp.* at 3% of the feed promoted growth and enhanced

77 pigmentation in juvenile *P. vannamei* (Cruz-Suárez et al. 2009; Elizondo-González et al.
78 2018). Similarly, dietary inclusion of *Sargassum sp.*, at 2.5% promoted growth by increasing
79 digestive enzyme activities in shrimp (Melchor-Martínez et al. 2023). Kelp meals, such as
80 *Macrocystis*, have also been evaluated in shrimp feed, showing no negative effect on growth
81 when included at levels below 10% (Cruz Suárez et al. 2008; Cárdenas et al. 2015).
82 Seaweed inclusion has additionally been shown to improve shrimp body composition.
83 Dietary supplementation with 4% *Macrocystis pyrifera* extract increased protein and
84 reduced lipid content in muscle (Gutiérrez-Leyva et al. 2015), while inclusion of 3.4% *Ulva*
85 *clathrata* in the diet enhanced phospholipids and essential fatty acids in the gonads of female
86 *P. vannamei* bloodstock (Corral-Rosales et al. 2019). Moreover, seaweeds contain a wide
87 range of bioactive compounds with nutraceutical properties that may benefit shrimp health,
88 including antioxidant, antibacterial and antiviral activities frequently associated with
89 sulfated polysaccharides and phenolic compounds (Múzquiz de la Garza et al. 2019;
90 Pourmozaffar et al. 2025).
91 In addition, digestive enzyme activities are widely used as functional biomarkers of
92 nutritional adequacy and digestive capacity in crustaceans, providing complementary
93 information to conventional growth indicators (Carrillo-Farnes et al. 2025). Additionally,
94 the assessment of digestive enzyme activities allowed the evaluation of physiological
95 response of shrimp to the experimental diets, providing insight into nutrient utilization
96 efficiency and the potential mechanisms underlying growth performance differences among
97 treatments (Hoseinifar et al. 2017). Consequently, to the best of our knowledge the complete
98 replacement of low-protein terrestrial plant ingredients with seaweed meals in *P. vannamei*
99 shrimp diets has not yet been evaluated. Therefore, the main objective of this study was to
100 evaluate the potential of partial or complete substitution of low-protein terrestrial plant
101 ingredients with seaweed meals in shrimp feeds, not only in terms of maintaining or
102 improving shrimp growth and nutritional performance, but also by quantifying their
103 contribution to overall feed sustainability. This approach may support the development of a
104 more resilient and resource-efficient aquaculture system by reducing dependence on
105 terrestrial crops and promoting the use of renewable marine biomass.

106

107 2. MATERIAL AND METHODS

108 **2.1 Seaweeds**

109 Seaweed meals used to replace wheat and sorghum (low-protein terrestrial plant ingredients)
110 in the diets were *Macrocystis sp.*, *Sargassum sp.*, *Egregia sp.*, and *Ulva lactuca*. The first
111 three species were obtained from natural oceanic stocks harvested by Baja Kelp® (Baja
112 California, MX) and processed as previously described by Muzquiz de la Garza et al 2019.
113 Briefly, seaweed fronds were washed with seawater to remove sand and epiphytes, sun-dried
114 inside a greenhouse, ground, and vacuum-packed until use. *Ulva lactuca* was originally
115 collected from La Paz Bay, Baja California Sur, Mexico and subsequently cultivated under
116 laboratory conditions at CIBNOR. Biomass was harvested after four weeks, oven-dried at
117 60 °C for 4 h, ground, and stored at 4 °C until use, as previously described by Omont et al.
118 (2019).

119

120 **2.2 Experimental diets**

121 Three different diets were designed with variations in the low-protein and high-carbohydrate
122 macronutrient ingredients: a control diet containing terrestrial plant ingredients (Ctr), a
123 seaweed-based diet (Swd), and a diet combining plant and seaweed ingredients (Mix).

124 All dry ingredients were ground to 400 µm prior to feed manufacturing. The feed was
125 prepared by mixing all dry ingredients in a 1.5-L KitchenAid™ mixer for 6 min until
126 homogenized, followed by the addition of oil-based ingredients and further mixing an
127 additional 6 min. Subsequently, 370 mL of purified water at 60°C was added and mixed for
128 5 min. The resulting dough was passed through a 2-mm die using a ¾-hp meat grinder
129 (Torrey, MX), and pellets were cut to a length of ~5 mm. The pellets were dried at 45°C for
130 12 h and stored at 4°C until further use.

131 **2.3 Proximal composition analysis**

132 The proximal composition of seaweeds (Table 1) and experimental diets (Table 2) was
133 determined according to standard methods: moisture (AOAC 930.15), crude protein (Dumas
134 method, AOAC 990.03), lipids (Soxtec Avanti, AOAC 920.39), crude fibre (AOAC 978.10),
135 and ash (AOAC 942.05). The nitrogen-free extract (NFE) was calculated by difference as
136 follows: 100 – (% protein + % lipids + % crude fiber + % ash).

137 **2.4 Feeding trial**

138 Juvenile *P. vannamei* (150 ± 20 mg) were supplied by a commercial hatchery Larvas Gran
139 Mar, S.A. de C.V., Mazatlan, Mexico, and transported to the Aquaculture Nutrition
140 Laboratory at CIBNOR. The organisms were acclimated and maintained in 700-L tanks
141 under controlled temperature conditions (28 ± 0.5 °C), at a salinity of 37.5 ± 0.3 ‰ and
142 100% daily water exchange. Shrimp were fed to apparent satiation using a commercial
143 pelleted diet (Camaronina Purina, 35% crude protein) until use for the feeding trial.

144 The feeding trial was conducted according to the ethical standards and specifications
145 described in the ARRIVE Guidelines (Kilkenny et al. 2010). The three dietary treatments
146 were evaluated in triplicate, with 8 juvenile shrimp (1.25 ± 0.2 g average initial weight) per
147 replicate, stocked in 60-L fiberglass tanks. Experimental tanks were supplied with
148 continuous aeration (dissolved oxygen, DO >5.0 mg L⁻¹), a controlled photoperiod (12:12 h
149 light:dark) and temperature (28.0 ± 0.2 °C), and filled with marine water filtered through 1-
150 µm mesh and sterilised with UV light (salinity 38.1 ± 0.3 ‰ and pH 8.04 ± 0.14). Water
151 quality parameters, including total ammonia nitrogen (<0.5 mg L⁻¹), nitrites (<0.25 mg L⁻¹),
152 nitrates (<5 mg L⁻¹), and phosphate (<0.25 mg L⁻¹), were monitored weekly using a
153 commercial test kit (API Marine, saltwater master test kit, US).

154 Shrimp were fed to apparent satiation with their respective diets, divided into two daily
155 rations (09:00 and 14:30 h). Feeding rate was initiated at 8% of biomass and adjusted daily
156 by increasing 1% relative to shrimp biomass when no residual feed was observed, or
157 decreasing it by 1% when uneaten feed remained in the experimental tank. Before the first
158 feeding of the day, uneaten feed, feces, and molts were removed by siphoning, followed by
159 60% of seawater exchange in each tank. At the end of the feeding trial, shrimp performance
160 was estimated based on the following parameters: final weight (FW), weight gain (WG),
161 specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR) and survival (equations were
162 described in the footnote of Table 3).

163 **2.5 Digestive enzymatic activities**

164 To determine digestive enzyme activities, the hepatopancreas of two shrimp (in the intermolt
165 stage) per replicate were sampled ($n = 6$), dissected, and stored in tubes at -80 °C until
166 analysis. Enzyme extracts were prepared by homogenizing individual hepatopancreas

167 samples in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) at a 1:4 (w/v) ratio, using a FastPrep-24
168 homogenizer (MP Biomedicals, US). The resulting homogenates were centrifuged at 12,000
169 × g for 10 min at 4 °C, and supernatants were collected and stored at −80 °C until further
170 use.

171 Protein content and enzymatic activities of trypsin, chymotrypsin, lipase, and amylase were
172 determined using a Varioskan Flash multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific,
173 US). Protein of each homogenate was determined following the Bradford method (Bradford
174 1976), using Bio-Rad Protein Assay dye reagent (Bio-Rad 500-0205) and bovine serum
175 albumin (BSA, Sigma A7906) as the standard, measuring absorbance at 495 nm.

176 Trypsin and chymotrypsin activities were measured fluorometrically according to Toledo et
177 al. (2011), using Boc-Gln-Ala-Arg-AMC hydrochloride (Sigma B4153) and Suc-Ala-Ala-
178 Pro-Phe-AMC (Sigma S9761) as substrates, respectively, prepared at 0.8 mmol L⁻¹ in
179 DMSO and Tris-HCl/CaCl₂ buffer (pH 8.0). Lipase activity was assessed using 4-
180 methylumbelliferyl heptanoate (50 mmol L⁻¹ in DMSO and phosphate buffer, pH 7.5).
181 Fluorescence for trypsin, chymotrypsin and lipase enzymes was recorded at 355 nm
182 excitation and 460 nm emission.

183 Amylase activity was quantified spectrophotometrically following the Métais and Bieth
184 (1968) method, using starch (3 g L⁻¹) in NaH₂PO₄ buffer (pH 7.4), and absorbance was read
185 at 580 nm after stopping the reaction with iodine. All enzyme activities were expressed as
186 units per milligram of protein (U mg protein⁻¹).

187 **2.6 Statistical analysis**

188 Data on shrimp zootechnical parameters and digestive enzyme activities were tested for
189 normality and homoscedasticity using the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. A
190 one-way ANOVA ($\alpha = 0.05$) followed by Tukey’s test, when applicable, was used to
191 compare the effect of dietary treatments. All statistical analyses were performed using R
192 software (R Core Team), version 4.2.2.

193

194 **3. RESULTS**

195 The chemical composition showed marked differences between terrestrial ingredients and
196 seaweeds (Table 1). Wheat and sorghum meals were characterized by high nitrogen-free
197 extract (NFE; >84%) and low ash content (<2%), whereas all seaweeds exhibited
198 substantially higher ash levels (35–46%) and lower NFE values (41–50%). Among
199 seaweeds, *U. lactuca* presented the highest crude protein content (17.23%), while *Egrecia*
200 *sp.* showed the highest crude fiber content (8.2%). Lipid levels were lower in seaweeds
201 (<0.3%) compared to wheat and sorghum (>1.3%).

202 The experimental diets remained isonitrogenous and isolipidic, with crude protein (~40%)
203 and lipid (~9%) levels (Table 2). The replacement of wheat and sorghum meals with
204 seaweeds resulted in a marked increase in ash content, which was highest in the Swd diet
205 (20.6%) and intermediate in the Mix diet (16.5%), compared to the control (10.3%).
206 Likewise, crude fiber increased with seaweed inclusion, particularly in the Swd diet (2.10%),
207 while the Mix diet showed intermediate values (1.23%). In contrast, nitrogen-free extract
208 (NFE) decreased in seaweed-containing diets, reaching the lowest level in the Swd treatment
209 (27.9%).

210 The zootechnical performance of shrimp fed the experimental diets for six weeks
211 demonstrated the feasibility of including substantial levels of seaweed biomass. Survival
212 rates were higher than 90% for all treatments, with no significant differences among diets (F
213 = 1.5, $p = 0.296$) (Table 3). The Swd diet, with 28.4% seaweed meal inclusion, resulted in
214 shrimp with higher final weight (FW) ($F = 0.357$, $p = 0.713$), weight gain (WG) ($F = 0.357$,
215 $p = 0.713$), and specific growth rate (SGR); however, no significant differences were
216 observed among treatments ($F = 0.373$, $p = 0.703$). Regarding feed conversion ratio (FCR),
217 the Swd diet showed lower values compared to the Ctr and Mix diets; nevertheless, no
218 significant differences were detected among treatments ($F = 0.548$, $p = 0.604$).

219 Digestive enzyme activities in the hepatopancreas of shrimp fed the experimental diets are
220 shown in Figure 3. Lipase activity ($F = 0.361$, $p = 0.711$) and protease activities, including
221 trypsin ($F = 0.402$, $p = 0.685$) and chymotrypsin ($F = 0.334$, $p = 0.728$), did not show
222 significant differences among dietary treatments. In contrast, amylase activity was
223 significantly higher in diets with partial (Mix) or complete substitution (Swd) of wheat and
224 sorghum compared to the control diet (Ctr) ($F = 12.04$, $p = 0.007$).

225 4. Discussion

226 4.1 Ingredients and experimental diet composition

227 The proximate composition of wheat meal was in accordance with the literature (Rakszegi
228 et al. 2008), showing a high nitrogen-free extract and low ash content compared to the
229 seaweed meals used in the present study. In contrast, the protein content of sorghum meal in
230 the present study (4.73%) was within the reported range for the *Sorghum bicolor* (Bakari et
231 al. 2023); however, higher values (up to 15%) have been reported for other varieties (Zarei
232 et al. 2023).

233 In the case of seaweeds, their chemical composition exhibits high phenotypic plasticity and
234 is strongly influenced by environmental factors, including temperature, nutrient availability,
235 and light intensity (Eggert 2012; Liesner et al. 2020; Tibbetts et al. 2016; Britton et al. 2021).
236 Overall, the proximate composition of the seaweeds used in the present study was within the
237 range reported in previous studies, with ash and nitrogen-free extract (NFE) representing the
238 major fractions. In the present study, the lipid, ash, and NFE contents of *Macrocystis sp.*
239 were within the range of previously reported values. However, the protein content was
240 slightly lower (6.13%) than values typically reported in the literature, which range from 8 to
241 17% (Ortiz et al. 2009; Astorga-España et al. 2016; Serviere-Zaragoza et al. 2022). Protein
242 content in this genus is known to exhibit high seasonal variability, which may partly explain
243 the lower values observed in this study (Serviere-Zaragoza et al. 2002; Westermeier et al.
244 2012). For *Sargassum sp.*, the proximate composition in the present study showed values
245 within the range of previous reports, with protein ranging from 4–10%, ash from 24–58%,
246 crude fiber from 5–10%, lipids from 0.2–1.6%, and NFE from 32–48% (Nazarudin et al.
247 2020; Ragaza et al. 2021; Tonon et al. 2022; Seyedalhosseini et al. 2024). Similarly, the
248 proximate composition of *Egregia sp.* was within reported ranges for ash (28.9–33.1%),
249 lipids (0.14–0.67%), protein (8.14–11.8%), fiber (7.2%), and NFE (38–54%) (Guerra-Rivas
250 et al. 2011; Muzquiz de la Garza et al. 2019). *U. lactuca* was the only seaweed obtained
251 through culture under controlled conditions and showed the highest protein content
252 compared to the seaweeds collected from the wild. Moreover, the protein content of *U.*
253 *lactuca* (17.23%) was higher than that commonly reported for wild-collected seaweeds,
254 which typically ranges around 10% (Yaich et al. 2011; Castro-González et al. 1996). This

255 difference may be attributed to controlled culture conditions, where nutrient availability can
256 be regulated to enhance protein content (Peña-Rodríguez et al. 2011). In addition, increases
257 in protein content in *Ulva spp.* have been associated with environmental eutrophication and
258 climate change (Gao et al. 2017).

259 In the experimental diets, the substitution of wheat and sorghum with seaweeds did not
260 substantially alter the protein contribution of the formulations. This is relevant because
261 maintaining dietary protein levels is essential to ensure adequate amino acid availability for
262 growth and tissue accretion in *P. vannamei*, and excessive fluctuations in protein intake may
263 negatively affect feed efficiency and nitrogen excretion. In contrast, partial or complete
264 replacement of wheat and sorghum with seaweed meals resulted in a clear increase in crude
265 fiber and ash content. This response is consistent with the intrinsic biochemical composition
266 of seaweeds, which commonly contain elevated concentrations of structural polysaccharides
267 such as cellulose, ulvan, laminarin, fucoidan, and alginates, as well as high levels of
268 inorganic minerals accumulated through ion-exchange processes (Salehi et al. 2019; Morais
269 et al. 2020). Such components typically increase both fiber and ash fractions in feed
270 formulations incorporating macroalgal biomass. Overall, these results indicate that seaweed
271 inclusion substantially modified the carbohydrate and mineral fractions of the diets without
272 affecting protein or lipid levels.

273 **4.2 Shrimp performance**

274 In response to the experimental diets, zootechnical results showed that the seaweed mix
275 inclusion levels used in the Swd and Mix diets were able to sustain growth performance
276 comparable to that of the conventional terrestrial plant-based control diet (Ctr). In general,
277 recommended inclusion levels of seaweed meals in shrimp feeds are typically below 10%
278 (Yu et al. 2016; Elizondo-González et al. 2018; Melchor-Martínez et al. 2023). For example,
279 low inclusion levels (0.05%) of powdered *Sargassum polycystum* or *Macrocystis integrifolia*
280 have been reported to improve shrimp growth and feed efficiency compared to the control
281 diet (Abdel-Rahim et al. 2021; Segarra et al. 2025). Similarly, dietary inclusion of 2.5% and
282 5% *Sargassum* collected from two different sites significantly enhanced shrimp growth after
283 a 35-day feeding trial (Melchor et al. 2023). The inclusion of 3% *U. lactuca* biomass

284 produced through wastewater bioremediation also improved growth performance and feed
285 conversion ratio (FCR) in *P. vannamei* (Elizondo-González et al. 2018).

286 Nevertheless, variations in shrimp growth responses to seaweed-based diets may be related
287 to interactions with other dietary ingredients. For instance, partial replacement of fishmeal
288 with 5–15% *U. lactuca* did not improve shrimp growth after a 75-day feeding trial
289 (Rodríguez-González et al., 2014). Seaweeds are not protein-rich ingredients for aquafeeds;
290 therefore, it is important to meet the nutritional requirements of shrimp. In this context,
291 replacing 30% of a balanced reference diet with different seaweed meals resulted in reduced
292 growth, attributed to the lower protein content of the experimental diets (Yang *et al.* 2018).
293 In the present study, total seaweed inclusion levels in the Swd and Mix diets were 28.4%
294 and 14.2%, respectively; however, when considering the individual contribution of each
295 seaweed species, the maximum inclusion level per seaweed was 7%. This level falls within
296 the range recommended by several authors to avoid negative effects on shrimp growth
297 associated with excessive macroalgal inclusion (Cruz-Suárez et al. 2009; Rodríguez-
298 González et al. 2014). Therefore, it is possible that the combination of different seaweed
299 meals diversifies the fiber and polysaccharide structure content, allowing a safe inclusion
300 level without compromising digestive capacity or nutrient utilization. Combinations of
301 seaweed in shrimp feed have proven to deliver beneficial physiological effects. For example,
302 *Sargassum* and *Undaria* included in 1%:2% and 1%:4% proportions in the diet enhanced
303 gut bacterial diversity and reduced cumulative mortality after a white spot syndrome virus
304 (WSSV) challenge under thermal fluctuation (Rezende et al. 2022).

305 **4.3 Digestive enzyme activities**

306 Previous studies have shown that the inclusion of seaweed may enhance digestive activity
307 in the shrimp hepatopancreas. The dietary levels of 2.5% and 5% of *Sargassum* enhanced
308 digestive enzyme activities including amylase, compared to a reference diet without seaweed
309 (Melchor et al. 2023). Additionally, enhancements in the intestinal epithelial surface have
310 been reported in shrimp fed *Sargassum*, suggesting a higher capacity for nutrient absorption
311 (Schleder et al. 2018). The use of predigested *Eisenia sp.* and *U. lactuca* at 10 or 20% as a
312 partial substitute for fishmeal and wheatmeal in the diet of *P. vannamei* also showed a

313 significant increase in amylase activity compared to the control diet (Omont et al. 2021),
314 suggesting a higher digestibility of seaweed carbohydrates than those from terrestrial plants.
315 Shrimp may exhibit a greater capacity to utilize carbohydrates derived from seaweeds than
316 those from terrestrial cereals such as wheat, potentially related to differences in
317 polysaccharide structure (Wu et al. 2014). On the other hand, seaweed polysaccharides such
318 as alginate, laminarin, and fucoidan may enhance digestive function and intestinal health
319 (Bakky et al. 2022; Chen et al. 2022), thereby improving carbohydrate utilization compared
320 to the predominantly starch-based carbohydrates of wheat or sorghum. These findings
321 highlight the importance of understanding how macroalgal polysaccharides interact with
322 other dietary components, which may help optimize their inclusion in practical shrimp feeds.
323 Despite the growing evidence supporting the partial inclusion of seaweed meals as practical
324 ingredient, functional additives or nutraceuticals, challenges related to seasonal variability
325 and nutrient composition should be considered when evaluating their potential as full
326 substitutes for terrestrial plant meals.

327 **5. Conclusions**

328 Seaweed meals partially or fully replacing wheat and sorghum did not negatively affect
329 growth or survival of *P. vannamei*. Although performance remained similar among
330 treatments, diets containing seaweed increased amylase activity, indicating a greater
331 capacity to utilize seaweed-derived carbohydrates and suggesting functional benefits beyond
332 basic nutrition. Overall, the use of meals of seaweed mixed with moderate inclusion levels
333 of each species (~7%) appears particularly promising, offering a balanced contribution of
334 nutrients and bioactive compounds while maintaining diet digestibility. These findings
335 support the feasibility of integrating mixes of diverse seaweed species into practical
336 formulations; however, validation under varying culture conditions, longer production
337 cycles, and alternative diets matrices is required to fully establish their nutrimental and
338 functional value in commercial shrimp aquafeeds

339.

340 **Acknowledgments**

341 We thank Ignacio Beamonte from Baja Kelp Talasoterapia S.A. de C.V. and Will Lagos
342 from Larvas Gran Mar S.A. de C.V., for kindly donating the seaweed meals and the juvenile

343 shrimp, respectively. We also thanks for technical assistance to Sandra de la Paz Reyes and
344 Gabriel Robles Villegas from the Laboratory of Aquaculture Nutrition at CIBNOR.

345

346 **Conflict of interest**

347 The authors declare there are no competing interests.

348

349 **Data Availability Statement**

350 Data available from corresponding author on request

351

352

353 **References**

- 354 Abdel-Rahim M, Bahattab O, Nossir F, Al-Awthan Y, Khalil RH, Mohamed R (2021)
355 Dietary supplementation of brown seaweed and/or nucleotides improved shrimp
356 performance, health status and cold-tolerant gene expression of juvenile whiteleg
357 shrimp during the winter season. Mar Drugs 19:175.
358 <https://doi.org/10.3390/md19030175>
- 359 AOAC (2005) Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical
360 Chemists, Arlington, V.A.
- 361 Astorga-España MS, Rodríguez-Galdón B, Rodríguez-Rodríguez EM, Díaz-Romero C
362 (2016) Amino acid content in seaweeds from the Magellan Straits (Chile). J Food
363 Compos Anal 53:77-84. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.09.004>
- 364 Bakky MAH, Tran NT, Zhang Y, Li S (2022) Utilization of marine macroalgae-derived
365 sulphated polysaccharides as dynamic nutraceutical components in the feed of aquatic
366 animals: a review. Aquac Res 53:5787–5808. <https://doi.org/10.1111/are.16078>
- 367 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram
368 quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem
369 72:248–254.
- 370 Britton D, Schmid M, Revill AT, Virtue P, Nichols PD, Hurd CL, Mundy CN (2021)
371 Seasonal and site-specific variation in the nutritional quality of temperate seaweed
372 assemblages: implications for grazing invertebrates and the commercial exploitation
373 of seaweeds. J Appl Phycol 33:603–616. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02302-1>
- 374 Cárdenas JV, Gálvez AO, Brito LO, Galarza EV, Pitta DC, Rubin VV (2015) Assessment
375 of different levels of green and brown seaweed meal in experimental diets for whiteleg
376 shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone) in recirculating aquaculture system. Aquac Int
377 23:1491–1504. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9899-2>
- 378 Carrillo-Farnés O, Forrellat-Barrios A, Guerrero-Galván S, Vega-Villasante F (2007) A
379 review of digestive enzyme activity in penaeid shrimps. Crustaceana 80:257–275.

380 Castro-González MI, Pérez-Gil F, Pérez-Estrella S, Carrillo-Domínguez S (1996). Chemical
381 composition of the green alga *Ulva lactuca*. *Cienc Mar* 22:205-213.
382 <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v22i2.853>

383 Chen G, Liu B, Chen J, Liu H, Tan B, Dong X, Yang Q, Chi S, Zhang S, Yao M (2022)
384 Supplementing sulfate-based alginate polysaccharide improves Pacific white shrimp
385 (*Litopenaeus vannamei*) fed fishmeal replacement with cottonseed protein
386 concentrate: effects on growth, intestinal health, and disease resistance. *Aquac Nutr*
387 2022:7132362. <https://doi.org/10.1155/2022/7132362>

388 Corral-Rosales C, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE, Arjona O, Palacios E (2019) Fatty
389 acids, sterols, phenolic compounds, and carotenoid changes in response to dietary
390 inclusion of *Ulva clathrata* in shrimp *Litopenaeus vannamei* broodstock. *J Appl*
391 *Phycol* 31:4009–4020. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01829-2>

392 Cruz Suárez LE, Tapia Salazar M, Nieto López MG, Ricque Marie D (2008) A review of
393 the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. In: Cruz Suárez LE, Ricque
394 Marie D, Tapia Salazar M, Nieto López MG (eds). *Avances en Nutrición Acuícola*.
395 Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N,L., pp. 304-333.

396 Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Guajardo-Barbosa C, Ricque-Marie D
397 (2009) Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and
398 *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquac Nutr* 15:421-430.
399 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00607.x>

400 Duarte CM, Bruhn, A. and Krause-Jensen, D. 2022. A seaweed aquaculture imperative to
401 meet global sustainability targets. *Nat Sustain* 5:185-193.
402 <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00773-9>

403 Eggert A (2012) Seaweed responses to temperature. In: Wiencke C, Bischof K (eds)
404 *Seaweed Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 47–66.

405 Elizondo-González R, Quiroz-Guzmán E, Escobedo-Fregoso C, Magallón-Servín P, Peña-
406 Rodríguez A (2018) Use of seaweed *Ulva lactuca* for water bioremediation and as feed
407 additive for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ* 6:e4459.
408 <https://doi.org/10.7717/peerj.4459>

- 409 FAO (2024) The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Blue Transformation in
410 action. Rome.
- 411 Froehlich HE, Runge CA, Gentry RR, Gaines SD, Halpern BS (2018) Comparative
412 terrestrial feed and land use of an aquaculture-dominant world. Proc Natl Acad Sci
413 USA 115:5295–5300. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801692115>
- 414 Gao G, Clare AS, Rose C, Caldwell GS (2017) Eutrophication and warming-driven green
415 tides (*Ulva rigida*) are predicted to increase under future climate change scenarios.
416 Mar Pollut Bull 114:439-447. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.003>
- 417 García-Poza S, Pacheco D, Cotas J, Marques JC, Pereira L, Gonçalves AM (2022) Marine
418 macroalgae as a feasible and complete resource to address and promote Sustainable
419 Development Goals (SDGs). Integr Environ Assess Manag 18:1148-1161.
420 <https://doi.org/10.1002/ieam.4598>
- 421 Guerra-Rivas G, Gómez-Gutiérrez CM, Alarcón-Arteaga G, Soria-Mercado IE, Ayala-
422 Sánchez NE (2011) Screening for anticoagulant activity in marine algae from the
423 Northwest Mexican Pacific coast. J Appl Phycol 23:495–503.
424 <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9618-3>
- 425 Gutiérrez-Leyva R, Roberto CC, Sonia RM, Dolores RA, Carmen RR, Margarita CV (2015)
426 Nutritional evaluation of seaweed *Macrocystis Pyrifera* as feed additive for juvenile
427 shrimp *Litopenaeus vannamei*. Abanico Vet 5:26-34.
- 428 Hernández-Sain A, Palacios-Mechetnov E, Soto-Rodriguez SA, Osuna-Ruiz I, Rojas-
429 Hernández PG, Hernández C (2025) Seaweed potential as nutraceutical and functional
430 food ingredient in shrimp aquaculture. Anim Feed Sci Technol 330:116540.
431 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2025.116540>
- 432 Hoekstra AY, Chapagain AK (2011) Globalization of water: Sharing the planet's freshwater
433 resources. John Wiley & Sons.
- 434 Hoseinifar SH, Dadar M, Ringø E (2017) Modulation of nutrient digestibility and digestive
435 enzyme activities in aquatic animals: The functional feed additives scenario. Aquac
436 Res 48:3987–4000. <https://doi.org/10.1111/are.13368>

437 Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience
438 Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoS
439 Biol 8:e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>

440 Liesner D, Shama LN, Diehl N, Valentin K, Bartsch I (2020) Thermal plasticity of the kelp
441 *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) across life cycle stages reveals the importance of
442 cold seasons for marine forests. Front Mar Sci 7:456.
443 <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00456>

444 Matos J, Cardoso C, Serralheiro ML, Bandarra NM, Afonso C (2024) Seaweed bioactives
445 potential as nutraceuticals and functional ingredients: A review. J Food Compos
446 Anal 133:106453. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106453>

447 Melchor-Martínez EM, Reyes AG, Morreeuw ZP, Flores-Contreras EA, Araújo RG,
448 Ramírez-Gamboa D, Sosa-Hernández JE, Iqbal HMN, González-Meza GM,
449 Bonaccorso AD, Peña-Rodríguez A, Parra-Saldívar R (2023) Comparative study on
450 the valorization of *Sargassum* from the Mexican Caribbean coast and Gulf of
451 California as an ingredient in healthy diets for shrimp farming. Aquac Rep 32:101709.
452 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101709>

453 Métais P, Bieth J (1968) Determination of alpha-amylase by a microtechnic. Ann Biol Clin
454 26:133–142.

455 Molina C (2009) Feed programs: maximizing feed and feeding efficiency in shrimp farming.
456 In: Browdy CL, Jory DE (eds) The rising tide, proceedings of the special session on
457 sustainable shrimp farming, pp 218–229. World Aquaculture Society, Baton Rouge.

458 Morais T, Inácio A, Coutinho T, Ministro M, Cotas J, Pereira L, Bahcevandziev K (2020)
459 Seaweed potential in the animal feed: a review. J Mar Sci Eng 8:559.
460 <https://doi.org/10.3390/jmse8080559>

461 Múzquiz de la Garza AR, Tapia-Salazar M, Maldonado-Muñiz M, de la Rosa-Millán J,
462 Gutiérrez-Urbe JA, Santos-Zea L, Barba-Dávila BA, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez
463 LE (2019) Nutraceutical potential of five Mexican brown seaweeds. Biomed Res Int
464 2019:3795160. <https://doi.org/10.1155/2019/3795160>

465 Nazarudin MF, Yusoff F, Idrus ES, Aliyu-Paiko M (2020) Brown seaweed *Sargassum*
466 *polycystum* as dietary supplement exhibits prebiotic potentials in Asian sea bass *Lates*
467 *calcarifer* fingerlings. *Aquac Rep* 18:100488.
468 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100488>

469 Nieto-López M, Tapia-Salazar M, Ricque-Marie D, Villarreal-Cavazos D, Lemme A, Cruz-
470 Suárez LE (2011) Digestibility of different wheat products in white shrimp
471 *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 319:369–
472 376. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.046>

473 Nunes AJ, Dalen LL, Leonardi G, Burri L (2022) Developing sustainable, cost-effective and
474 high-performance shrimp feed formulations containing low fish meal levels. *Aquac*
475 *Rep* 27:101422. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101422>

476 Omont A, Elizondo-González R, Escobedo-Fregoso C, Tovar-Ramírez D, Hinojosa-Baltazar
477 P, Peña-Rodríguez A (2021) Bacterial communities and digestive enzymatic activities
478 of *Litopenaeus vannamei* shrimp fed pre-digested seaweeds as a functional ingredient.
479 *J Appl Phycol* 33:1239–1251. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02381-8>

480 Ortiz J, Uquiche E, Robert P, Romero N, Quitral V, Llantén C (2009) Functional and
481 nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and
482 *Macrocystis pyrifera*. *Eur J Lipid Sci Tech* 111:320-327.
483 <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800140>

484 Peña-Rodríguez A, Mawhinney TP, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE (2011) Chemical
485 composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chem*
486 129:491-498. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.104>

487 Peña-Rodríguez A, Pelletier-Morreeuw Z, García-Luján J, Rodríguez-Jaramillo MDC,
488 Guzmán-Villanueva L, Escobedo-Fregoso C, Tovar-Ramírez D, Reyes AG (2020)
489 Evaluation of *Agave lechuguilla* by-product crude extract as a feed additive for
490 juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Res* 51:1336–1345.
491 <https://doi.org/10.1111/are.14497>

492 Pourmozaffar S, Reverter M, Jahromi ST, Harikrishnan R, Pazir MK, Barzkar N,
493 Mozanzadeh MT, Sarvi B, Abolfathi M, Adeshina I, Behzadi S, Raji A (2025) An

494 overview of the biological functions and mechanisms of action of medicinal plants and
495 seaweeds in shrimp culture. *J Anim Physiol Anim Nutr* 109:291–337.
496 <https://doi.org/10.1111/jpn.14049>

497 Ragaza JA, Hossain MS, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Kotzamanis Y, Brezas A,
498 Kumar V (2021) Brown seaweed (*Sargassum fulvellum*) inclusion in diets with
499 fishmeal partially replaced with soy protein concentrate for Japanese flounder
500 (*Paralichthys olivaceus*) juveniles. *Aquac Nutr* 27:1052-1064.
501 <https://doi.org/10.1111/anu.13246>

502 Rakszegi M, Boros D, Kuti C, Láng L, Bedo Z, Shewry PR (2008) Composition and end-
503 use quality of 150 wheat lines selected for the HEALTHGRAIN diversity screen. *J*
504 *Agric Food Chem* 56:9750– 9757.

505 Rezende PC, Miranda C, Fracalossi DM, Hayashi L, Seiffert WQ, do Nascimento Vieira F,
506 Schleder DD (2022) Brown seaweeds as a feed additive for *Litopenaeus vannamei*
507 reared in a biofloc system improved resistance to thermal stress and white spot disease.
508 *J Appl Phycol* 34:2603–2614. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02760-9>

509 Robledo D, Vázquez-Delfín E, Freile-Pelegrín Y, Vázquez-Elizondo RM, Qui-Minet ZN,
510 Salazar-Garibay A (2021) Challenges and opportunities in relation to *Sargassum*
511 events along the Caribbean Sea. *Front Mar Sci* 8:699664.
512 <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.699664>

513 Rodríguez-González H, Orduña-Rojas J, Villalobos-Medina JP, García-Ulloa M, Polanco-
514 Torres A, López-Álvarez ES, Montoya-Mejía M, Hernández-Llamas A (2014) Partial
515 inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white
516 leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Appl Phycol* 26:2453–2459.
517 <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0272-z>

518 Salehi B, Sharifi-Rad J, Seca AM, Pinto DC, Michalak I, Trincone A, Mishra AP, Nigam
519 M, Zam W, Martins N (2019) Current trends on seaweeds: looking at chemical
520 composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. *Molecules* 24:4182.
521 <https://doi.org/10.3390/molecules24224182>

522 Schleder DD, Peruch LGB, Poli MA, Ferreira TH, Silva CP, Andreatta ER, Hayashi L, do
523 Nascimento Vieira F (2018) Effect of brown seaweeds on Pacific white shrimp growth
524 performance, gut morphology, digestive enzymes activity and resistance to white spot
525 virus. *Aquaculture* 495:359–365. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.020>

526 Segarra S, Calvo-Perez JD, Talledo JA, Chau T, Hoang P, Tran L (2025) Supplementation
527 with nucleotides and seaweed meal enhances immunity, growth performance and
528 resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific white shrimp. *Aquac Rep* 45:103081.
529 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2025.103081>

530 Serviere-Zaragoza E, Gómez-López D, Ponce-Díaz G (2002) Gross chemical composition
531 of three common macroalgae and a sea grass on the Pacific coast of Baja California,
532 Mexico. *Hidrobiologica*, 12(2), 113-118.

533 Seyedalhosseini SH, Salati AP, Torfi Mozanzadeh M, Parrish CC, Shahriari A,
534 Ahangarzadeh M (2024) Effect of dietary seaweed (*Gracilaria pulvinata* and
535 *Sargassum ilicifolium*) on serum and mucosal immunity, some growth and immune-
536 related genes expression, antioxidant status, and fatty acid profile in Asian Seabass
537 (*Lates calcarifer*). *Aquac Nutr* 2024:3683163. <https://doi.org/10.1155/2024/3683163>

538 Spillias S, Valin H, Batka M, Sperling F, Havlík P, Leclère D, Cottrell RS, O'Brien KR,
539 McDonald-Madden E (2023) Reducing global land-use pressures with seaweed
540 farming. *Nat Sustain* 6:380–390. <https://doi.org/10.1038/s41893-022-01043-y>

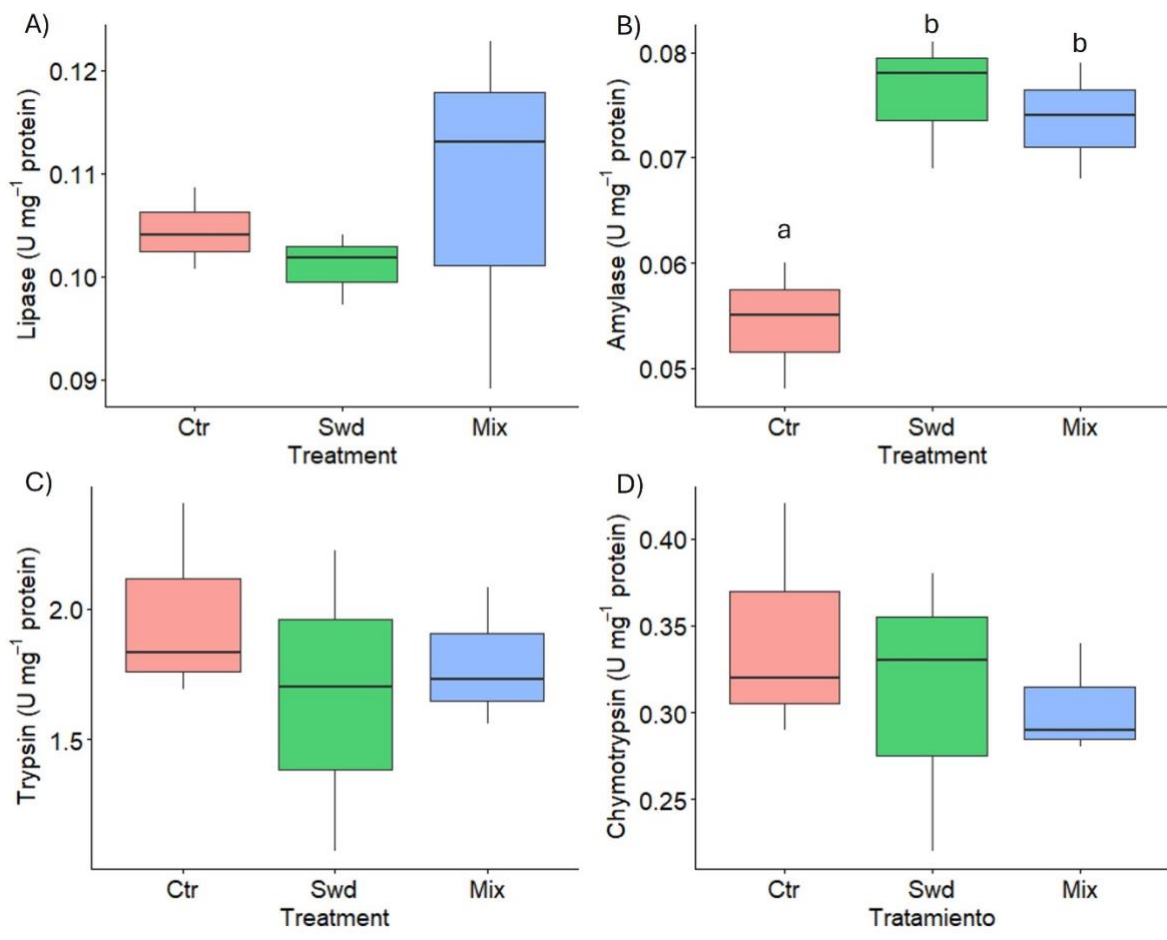
541 Tacon AGJ, Jory D, Nunes A (2013) Shrimp feed management: issues and perspectives. In:
542 Hasan MR, New MB (eds) *On-farm feeding and feed management in aquaculture*.
543 *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 583*, FAO, Rome, pp 481–488.

544 Tibbetts SM, Milley JE, Lall SP (2016) Nutritional quality of some wild and cultivated
545 seaweeds: Nutrient composition, total phenolic content and in vitro digestibility. *J*
546 *Appl Phycol* 28:3575–3585. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0863-y>

547 Toledo EM, Moyano-López FJ, Tovar-Ramírez D, Strüssmann CA, Alvarez-González CA,
548 Martínez-Chávez CC, Martínez-Palacios CA (2011) Development of digestive
549 biochemistry in the initial stages of three cultured atherinopsids. *Aquac Res* 42:776–
550 786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02853.x>

- 551 Tonon T, Machado CB, Webber M, Webber D, Smith J, Pilsbury A, Cicéron F, Herrera-
552 Rodriguez L, Jimenez EM, Suarez JV, Ahearn M, Gonzalez F, Allen MJ (2022)
553 Biochemical and elemental composition of pelagic sargassum biomass harvested
554 across the caribbean. *Phycology* 2:204-215.
555 <https://doi.org/10.3390/phycology2010011>
- 556 Wang S, Huo Y, Zhang J, Cui J, Wang Y, Yang L, Zhou Q, Lu Y, Yu K, He P (2018)
557 Variations of dominant free-floating *Ulva* species in the source area for the world's
558 largest macroalgal blooms, China: differences of ecological tolerance. *Harmful Algae*
559 74:58–66. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.03.007>
- 560 Westermeier R, Murúa P, Patiño DJ, Muñoz L, Ruiz A, Müller DG (2012) Variations of
561 chemical composition and energy content in natural and genetically defined cultivars
562 of *Macrocystis* from Chile. *J Appl Phycol* 24:1191-1201.
563 <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9752-6>
- 564 Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H (2011) Chemical composition
565 and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food*
566 *chemistry*, 128(4), 895-901. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.114>
- 567 Yang F, Xie S, Niu J, Liu Y, Tian L (2018) Effect of dietary macro-algae in the diet of
568 juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Appl Phycol* 30:1335–1344.
569 <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1323-z>
- 570 Yu YY, Chen WD, Liu YJ, Niu J, Chen M, Tian LX (2016) Effect of different dietary levels
571 of *Gracilaria lemaneiformis* dry powder on growth performance, hematological
572 parameters and intestinal structure of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus*
573 *vannamei*). *Aquaculture* 450:356–362.
574 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.037>
- 575 Zarei M, Amirkolaei AK, Trushenski JT, Sealey WM, Schwarz MH, Ovissipour R (2022)
576 Sorghum as a potential valuable aquafeed ingredient: Nutritional quality and
577 digestibility. *Agriculture* 12:669. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050669>

578 Figure 1. Digestive enzyme activity of A) lipase, B) amylase, C) trypsin, and D)
 579 chymotrypsin in the hepatopancreas of *P. vannamei* after six weeks of feeding with diets
 580 containing terrestrial plant ingredients (Ctr), seaweed (Swd), or a combination of both (Mix).
 581 Data are mean \pm SD, and different letters indicate significant differences among treatments
 582 as determined by Tukey's test ($p < 0.05$) (n = 6).
 583



584
 585
 586
 587
 588
 589
 590
 591
 592

593 Table 1. Proximate composition (% on dry matter basis) of low-protein terrestrial
 594 ingredients and seaweed meals.

Ingredient	Crude protein	Lipids	Crude fiber	Ash	NFE
Wheatmeal	10.26	1.33	2.06	1.87	84.48
Sorghum meal	4.73	3.02	1.33	1.56	89.36
<i>Macrocystis sp.</i>	6.13	0.18	6.53	46.17	40.99
<i>Sargassum sp.</i>	6.57	0.28	5.46	38.12	49.57
<i>Egregia sp.</i>	11.05	0.25	8.20	35.19	45.31
<i>Ulva lactuca</i>	17.23	0.25	1.40	37.53	43.59

595 NFE = Nitrogen-free extract, estimated by difference.

596

597 Table 2. Composition (g kg⁻¹ diet) and proximate analysis (% on dry matter basis) of
 598 experimental diets.

Ingredients	Ctr	Swd	Mix
Fish meal ^a	130	130	130
Soybean meal ^b	300	300	300
Poultry by products meal ^c	220	220	220
Wheatmeal ^d	234	-	117
Sorghum meal ^e	50	-	25
<i>Macrocystis sp.</i> ^f	0	71	35.5
<i>Sargassum sp.</i> ^f	0	71	35.5
<i>Egregia sp.</i> ^f	0	71	35.5
<i>Ulva lactuca</i> ^g	0	71	35.5
Soy lecithin ^h	25	25	25
Fish oil ^a	25	25	25
Alginic acid ⁱ	10	10	10
Vitamin-mineral premix ^{ij}	4	4	4
Vitamin C ^k	1	1	1
Choline ^j	1	1	1
Total	1000	1000	1000
Proximate analysis (% on a dry basis)			
Crude protein	40.1	40.3	40.0
Lipids	9.2	9.0	8.9
Crude fiber	0.77	2.10	1.23
Ash	10.3	20.6	16.5
NFE	39.6	27.9	33.4

599 ^a San Carlos, Baja California Sur, MX.
 600 ^b PIASA SA de CV, Baja California Sur, MX.
 601 ^c CYGA de México, CDMX, MX.
 602 ^d Molino San Cristóbal, Sonora, MX.
 603 ^e Harinas Viesca, CDMX, MX.
 604 ^f Baja Kelp®, Baja California, MX
 605 ^g CIBNOR, Baja California Sur, MX.
 606 ^h Cedrosa SA de CV, Estado de México, MX.
 607 ⁱ Sigma Aldrich, Missouri, US.
 608 ^j Detailed content in Peña-Rodríguez *et al.* (2020).
 609 ^k Prilabsa, Sinaloa, MX.

610
 611
 612
 613

614 Table 3. Growth performance, feed conversion ratio, and survival of shrimp after six weeks
 615 of feeding the experimental diets containing terrestrial plant ingredients (Ctr), seaweeds
 616 (Swd) or a combination of both (Mix).

	Ctr	Swd	Mix	<i>P</i> -value
FW (g)	6.41 ± 0.34	6.49 ± 0.09	6.30 ± 0.33	0.713
WG (%)	413 ± 27	420 ± 7	404 ± 27	0.713
SGR (% day ⁻¹)	3.89 ± 0.12	3.92 ± 0.03	3.85 ± 0.13	0.702
FCR	1.82 ± 0.20	1.77 ± 0.05	1.81 ± 0.07	0.604
Survival (%)	96 ± 7	100 ± 0	92 ± 7	0.296

617 Average initial weight = 1.25 ± 0.2 g

618 Values are given as mean ± SD of triplicate determinations.

619 FW (g) = average final weight

620 WG (%) = 100 x (FW –Initial weight)/ Initial weight

621 SGR (% day⁻¹) = 100*(ln FW– ln initial weight) / number of days

622 FCR = total of feed provided per shrimp during feeding trial / (FW-initial weight)

623 Survival (%) = final number of shrimp / initial number shrimp*100

624