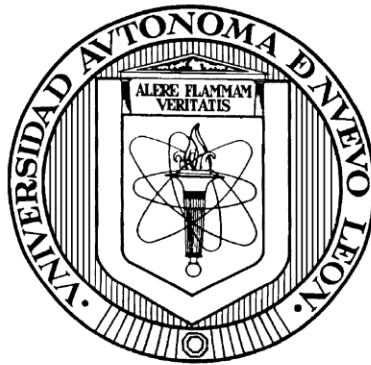


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“Efecto dietario de una biomasa bacteriana y *Arthrospira platensis* (Spirulina) sobre los parámetros de rendimiento, asimilación de nutrientes, microbiota intestinal y protección hepática en tilapia (*Oreochromis niloticus*)”**

**POR**

MVZ Lourdes Ixchel Xochipa Hernández

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**


**Diciembre de 2023**


**“Título de Efecto dietario de una biomasa bacteriana y *Arthrospira platensis* (Spirulina) sobre los parámetros de rendimiento, asimilación de nutrientes, microbiota intestinal y protección hepática en tilapia (*Oreochromis niloticus*)”**

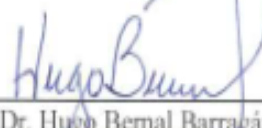
Aprobación de tesis por el comité particular de


*Lourdes Ixchel Xochipa Hernández*


**COMITÉ DE TESIS**


  
\_\_\_\_\_  
Dr. Oscar Daniel García Pérez  
Presidente

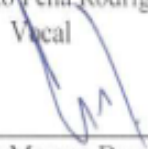
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Julian Gamboa Delgado  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Hugo Bernal Barragán  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. David Villarreal Cavazos  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Julio César Cruz Valdez  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Peña Rodríguez  
Vocal

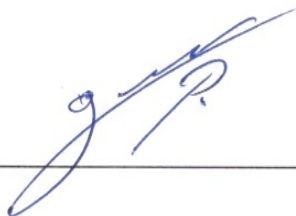
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gustavo Moreno Degollado  
Vocal

**“Efecto dietario de una biomasa bacteriana y *Arthrospira platensis*  
(Spirulina) sobre los parámetros de rendimiento, asimilación de  
nutrientes, microbiota intestinal y protección hepática en tilapia  
(*Oreochromis niloticus*)”**

Aprobación de tesis por el comité particular de

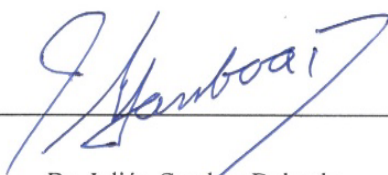
*Lourdes Ixchel Xochipa Hernández*

**COMITÉ DE TESIS**



---

Dr. Oscar Daniel García Pérez  
Director



---

Dr. Julián Gamboa Delgado  
Director o Codirector Externo



---

Dr. Uziel Castillo Velázquez  
Subdirector de Posgrado e Investigación

## AGRADECIMIENTOS

Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos tus logros que son resultado de tu ayuda, y cuando caigo me das las fuerzas para volverme a levantar y cumplir mis metas, me doy cuenta de que las batallas que pones frente a mí solo son pruebas que me ayudan a ser una persona más fuerte.

Agradezco al Dr. Oscar García por permitirme ser su tesista y darme la oportunidad de obtener más conocimientos sobre la acuicultura. Agradezco al Dr. Julián Gamboa por apoyarme y motivarme todos los días y a tenerme paciencia, al igual que a compartir todos sus conocimientos conmigo para que este trabajo saliera adelante. Al Dr. Hugo Bernal por su apoyo en la elaboración de dietas y a forjarme como estudiante de maestría. Dr. David Villarreal por su apoyo e interés en este proyecto. Dr. Alberto Peña por darme la oportunidad de aprender más sobre metagenómica y su apoyo durante la interpretación de los datos, así como de abrirme las puertas para poder conocer más sobre la ciencia. Dr. Julio Cruz Valdez por apoyarme en la parte de las enzimas y ser un buen profesor.

Agradezco a los departamentos de Nutrición y Acuicultura, a Julia por ser una gran técnica y por brindarme su apoyo en la realización de análisis proximales, así mismo, a la Dra. Nydia por el apoyo en la elaboración de los estudios y por permitirme terminar mis estudios de bromatología en el laboratorio de nutrición de la Facultad de Agronomía. También agradezco a la Bióloga Carolina por su apoyo en el laboratorio de acuicultura.

Por otra parte, agradezco a mis amigas Sandy Franyutti, Manuela Estefanía Villanueva y Jocelyn Cyan Puga por apoyarme y motivarme durante toda la maestría sin ellas no hubiera podido lograrlo. También agradezco a Jonathan Emmanuel por ser un gran amigo y compañero de maestría y a Pilar Salas por ser una buena compañera.

Gracias a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), sobre todo al departamento de Posgrados de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia por su apoyo en el proceso de los trámites.

## **DEDICATORIA**

La vida se encuentra plegada de retos, y uno de ellos fue la maestría. Tras verme dentro de ella, me di cuenta de que la vida nos forja de manera sabia, para poder darme la fortaleza que necesito para siempre alcanzar mis metas y logros y nunca darme por vencida, por lo que dedico esta tesis a mi madre Julieta Hernández, a mi padre Oscar Xochipa y a mí misma por creer en mí y por no darme por vencida.

El desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que, si puedo hacer, es afirmar que durante todo este tiempo pude conocer y disfrutar cada momento, aunque haya sido el más difícil y sobre todo que me ayudo a creer en mí y en lo que puedo ser capaz de realizar.

# ÍNDICE

## Tabla de contenido

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 ACUACULTURA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 CULTIVO DE LA TILAPIA DEL NILO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2.1 TAXONOMÍA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.2 REQUERIMIENTOS DE LA TILAPIA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3 ALIMENTACIÓN DE LA TILAPIA Y EL USO PROTEINAS ALTERNATIVAS</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4 PROTEINAS UNICELULARES</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4.1 ARTHROSPIRA PLATENSIS</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4.2 EJEMPLOS DE BIOMASAS MICROBIANAS</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5 ANÁLISIS PROTEICO (LA DIGESTIBILIDAD Y LA ASIMILACIÓN COMO INDICADORES DE DESEMPEÑO NUTRICIONAL)</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5.1 MARCADORES ISOTÓPICOS</b> .....	<b>14</b>
<b>2.6 BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS DEL HÍGADO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.7 COMUNIDADES BACTERIANAS EN OREOCHROMIS NILOTICUS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.7.1 EFECTOS NUTRICIONALES EN LA MUCOSA DE LOS PECES</b> .....	<b>19</b>

<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>21</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>22</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>22</b>
5.1	OBJETIVO GENERAL .....	22
5.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
6.1	LUGAR DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	24
6.2	ÁREA Y TIEMPO DE MUESTREO .....	24
6.3	DIETAS EXPERIMENTALES .....	25
6.4	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
6.4.1	INSTALACIONES DEL BIOENSAYO .....	28
6.4.2	ANIMALES EXPERIMENTALES .....	29
6.4.3	PROTOCOLO DE ALIMENTACIÓN .....	29
6.5	PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS.....	30
6.6	ANÁLISIS ISOTÓPICO.....	31
6.6.1	ESTIMACIÓN DE LAS CONTRIBUCIONES NUTRICIONALES AL CRECIMIENTO .....	32
6.6.2	TASA DE RECAMBIO DE NUTRIENTES Y TIEMPO MEDIO RESIDENCIAL ELEMENTAL EN EL TEJIDO .....	33
6.7	BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS .....	34
6.7.1	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	34
6.7.2	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS .....	35
6.7.3	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CE, ALP Y GST .....	35
6.7.4	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA .....	36
6.8	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE LA TILAPIA	
	36	
6.8.1	EXTRACCIÓN CUANTIFICACIÓN DEL ADN .....	36
6.8.3	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	37
6.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	37
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>

<b>7.1</b>	<b>ANÁLISIS DE DIETAS.....</b>	<b>39</b>
<b>7.1.1</b>	<b>COMPOSICIÓN DE LOS INGREDIENTES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>39</b>
<b>7.2</b>	<b>RENDIMIENTO PRODUCTIVO DE LA TILAPIA.....</b>	<b>40</b>
<b>7.3</b>	<b>CAMBIOS ISOTÓPICOS Y FACTORES DE DISCRIMINACIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>7.4</b>	<b>NITRÓGENO Y CARBONO TIEMPOS MEDIOS DE RESIDENCIA.....</b>	<b>43</b>
<b>7.5</b>	<b>CONTRIBUCIONES DE CARBONO Y NITRÓGENO PROVENIENTES DE LOS TRES INGREDIENTES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>44</b>
<b>7.6</b>	<b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA HEPÁTICA .....</b>	<b>45</b>
<b>7.7</b>	<b>CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LA TILAPIA.....</b>	<b>47</b>
<b>7.7.1</b>	<b>EFFECTOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA .....</b>	<b>47</b>
<b>7.7.2</b>	<b>CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE PHYLUM, CLASE Y FAMILIA .....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>8.1</b>	<b>RENDIMIENTO PRODUCTIVO DE LA TILAPIA .....</b>	<b>51</b>
<b>8.2</b>	<b>ISÓTOPOS ESTABLES.....</b>	<b>54</b>
<b>8.2.1</b>	<b>CAMBIOS ISOTÓPICOS Y FACTORES DE DISCRIMINACIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>8.2.2</b>	<b>NITROGENO Y CARBONO: TIEMPO MEDIO EN TEJIDO MUSCULAR.....</b>	<b>56</b>
<b>8.2.3</b>	<b>APORTES DE NUTRIENTES DE LA HARINA DE PESCADO, ARTHROSPIRA PLATENSIS Y BIOMASA MICROBIANA .....</b>	<b>57</b>
<b>8.3</b>	<b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>58</b>
<b>8.4</b>	<b>CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LA TILAPIA .....</b>	<b>61</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVA.....</b>	<b>67</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de cultivo de la tilapia desde la reproducción hasta la venta al mercado. El contenido nutricional de la dieta y la alimentación influirán en la duración de cada etapa. (Adaptado por: Wing-Keong y Romano, 2013). .....6
- Figura 2.** Proteínas alternativas a la harina de pescado para la tilapia (*Oreochromis niloticus*). Basado en: El-Sayed (1999).....9
- Figura 3.** Valores de isótopos estables de nitrógeno (‰) en el tejido muscular de las tilapias alimentadas con dietas experimentales formuladas con harina de pescado (H) y adicionadas con *Arthospira platensis* (AP) y biomasa microbiana (BM). Las líneas de tendencia exponencial representan el promedio de los resultados obtenidos al realizar el análisis de isótopos estables en músculo en los diferentes días de muestreo y las líneas punteadas horizontales representan los valores isotópicos de los ingredientes. ....42
- Figura 4.** Valores de isótopos estables de carbono (‰) en el tejido muscular de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas con dietas experimentales formuladas con harina de pescado (H) y adicionadas con *Arthospira platensis* (AP) y biomasa microbiana (BM).....42
- Figura 5.** Actividad enzimática de CE 5(A), GST 5(B) y ALP 5(C) en las cinco dietas experimentales, con exposición al diésel (D) y con aceite de pescado (A) en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). .....46
- Figura 6.** Los grupos de diversidad a nivel de OTU, se representa en gráfico de componentes principales (PCA) mostrando el grupo de tratamientos a nivel familia a los 30 días del bioensayo experimental.....47
- Figura 7.** Abundancia relativa de las comunidades bacterianas (phylum) presentes en el tejido intestinal de tilapias colectadas el día 30 del bioensayo, las cuales estuvieron bajo cinco dietas experimentales compuestas por AP, BM y HP. (n=3) .....48
- Figura 8.** Comunidades bacterianas a nivel de Clase obtenidas de las muestras de intestino de la tilapia tomada el día 30 del bioensayo que estuvieron bajo cinco dietas experimentales (n=3).....49

**Figura 9.** Comunidades bacterianas de los cinco tratamientos experimentales a nivel de Familia obtenidas de muestras de intestino de tilapia del día 30 del bioensayo, representadas mediante un gráfico de barras. ....50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Formulaciones alimenticias para tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) para la diferentes etapas de crecimiento (Wing-Keong y Romano, 2013). .....	7
<b>Tabla 2.</b> Análisis proximales de los ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas experimentales.....	26
<b>Tabla 3.</b> Formulación (g/1000 g de dieta) de cinco dietas experimentales para juveniles de tilapia del Nilo, utilizadas para evaluar parámetros de crecimiento, protección hepática y la asimilación de <i>Arthrospira platensis</i> (AP) y biomasa microbiana (BM) con respecto a la harina de pescado (H).....	27
<b>Tabla 4.</b> Cálculos de los parámetros zootécnicos en animales de producción. ....	30
<b>Tabla 5.</b> Análisis proximal (%; g/1000 g; Kcal/g) de las cinco dietas experimentales formuladas para estimar la contribución de nitrógeno dietario a partir de harina de pescado (H), <i>Arthrospira platensis</i> (AP) y biomasa microbiana (BM).....	39
<b>Tabla 6.</b> Parámetros zootécnicos de la tilapia del Nilo, después de los 30 días de bioensayo. ....	40
<b>Tabla 7.</b> Tasas de crecimiento (k), tasas estimadas de recambio metabólico (m) y tiempo medio de residencia ( $t_{50}$ ) del nitrógeno y carbono en tejido muscular de tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) alimentadas con diferentes dietas formuladas con harina de pescado (H), <i>Arthrospira platensis</i> (AP) y biomasa microbiana, ProFloc™ (BM).....	43
<b>Tabla 8.</b> Proporciones relativas de nitrógeno y carbono dietético asimilado en la tilapia del Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) sometidas a diferentes tratamientos. Las proporciones de C y N en las dietas se consideran como proporciones esperadas y las obtenidas en tejido muscular se consideran las proporciones observadas. ....	44

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA

### SÍMBOLO O DESCRIPCIÓN ABREVIATURA

A	Aceite
ALP	Fosfatasa alcalina
AP	<i>Arthrospira platensis</i>
BM	Biomasa microbiana
C	Carbono
CDNB	2,4-Dinitrochlorobenzene
CE	Carboxilesterasa
d	días
D <sub>2</sub>	Diésel
FCA	Factor de conversión alimenticia
g	gramos
g/org	Gramos sobre organismos
GP	Ganancia de peso
GST	Glutation-S-transferasa
H	Harina de pescado
h	horas
HAP's	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
IFFO	Organización de ingredientes marinos
K	Tasa de crecimiento
L	litros
m	Recambio metabólico
Mt	Millones de toneladas
mg/L	Miligramos sobre litros
min	minutos
ml	militros

mm	Milímetro
N	Nitrógeno
NRC	Current National Research Council
OTU's	Unidad taxonómica operativa
PCA	Primer componente principal
PCR	Reacción de cadena polimerasa
ppm	Parte por millón
rpm	Revoluciones por minuto
SIA	Análisis de isótopos estables
SIF	Stable Isotope Facility
TC	Tasa de crecimiento
μl/kg	Micro litro sobre kilogramo
δ	Delta en minúscula
Δ	Delta en mayúscula
‰	Partes por mil

## RESUMEN

La Spirulina y otras fuentes de proteínas unicelulares se han destacado por ser ingredientes confiables en los alimentos para organismos acuáticos debido a su alto contenido proteico y sus beneficios nutricionales. Existen varios métodos analíticos para determinar el desempeño nutricional de los alimentos y en el presente estudio se aplicaron mediciones de isótopos estables para explorar el aporte de nutrientes al crecimiento de juveniles en tilapia (*Oreochromis niloticus*). No obstante, se conoce poco acerca del impacto de diversos ingredientes experimentales sobre la composición de la biota intestinal y su capacidad de proteger contra la exposición a diésel (D). El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto sobre el crecimiento, asimilación de nutrientes y protección hepática, así como conocer la biota bacteriana al incluir una biomasa bacteriana (ProFloc™) y una cianobacteria (*Arthrospira platensis*, Agrovitae®) en dietas experimentales elaboradas para la tilapia. Se formularon cinco dietas experimentales, para reemplazar gradualmente la harina de pescado (isonitrogenadas: 40.5% de proteína cruda e isoenergéticas: 4.9 kcal/g), las dietas fueron formuladas con tres ingredientes principales: harina de pescado (Sardina premium®, 68% proteína), *A. platensis*, Agrovitae® (63% proteína) y biomasa microbiana, ProFloc™ (68% Proteína). Los dos últimos ingredientes se agregaron a niveles aditivos al 3 y 6%, en relación con la proteína dietaria. En total, se utilizaron 320 alevines con un peso promedio inicial de  $0.8 \pm 0.01$  g y se mantuvieron en 20 acuarios (4 acuarios replicados por tratamiento) bajo alimentación *ad libitum* por 30 días. Los parámetros evaluados, como la ganancia de peso (GP), la tasa de crecimiento (TC) y el factor de conversión alimenticia (FCA), mostraron resultados similares ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos. La exposición a diésel ocasionó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la actividad de la enzima de fase I, carboxilesterasa (CE) en todos los tratamientos experimentales. La enzima de fase II, glutatión-S-transferasa (GST) también fue incrementada a excepción de los peces alimentados con la BM. La mayor actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en el hígado se observó para el tratamiento D+3AP y D+6BM. Para determinar la asimilación de los nutrientes aportados por las dietas experimentales, se realizó un análisis de los valores isotópicos de nitrógeno  $\delta^{15}\text{N}$  y carbono  $\delta^{13}\text{C}$  en dietas y en el tejido muscular de los peces. Las dietas con inclusión de 3% en ambos tipos de

biomasa microbiana promovieron una mayor tasa de crecimiento ( $k$ ) y recambio metabólico ( $m$ ) tanto para carbono como nitrógeno, de igual manera aportaron carbono y nitrógeno estructural a la biosíntesis de músculo en los juveniles de tilapia. Los valores isotópicos  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de los peces se incrementaron inmediatamente a partir del día 0 y promovieron equilibrio isotópico con sus respectivas dietas. En cuanto a los cambios en las comunidades bacterianas, se observaron diferencias significativas entre las bacterias a nivel phylum, clase y familia a los 30 días del bioensayo. Los resultados demuestran un buen desempeño nutricional de las diferentes dietas de igual forma que la dieta control sobre el rendimiento de los peces.

## 1. INTRODUCCION

Desde el inicio del siglo XXI, la acuicultura ha tenido una tasa de crecimiento del 5.3% anual, y actualmente provee más de la mitad de los peces para consumo humano directo. En el año 2020, se reporta una producción acuícola total de 88 millones de toneladas, lo que representa el 49% de la producción mundial. La industria de alimentos para la acuicultura representa uno de los sectores con mayor tasa de crecimiento y valor económico, dado que representa el 70% de los costos en una producción acuícola (FAO, 2022; Kari *et al.*, 2022; Vázquez-Vera y Chávez-Carreño, 2022). De acuerdo con los datos proporcionados por la FAO (2022), se pronostica que la elaboración de alimentos para organismos acuáticos aumente un 13% para el año 2030. En México, la producción acuícola alcanzó una producción total de 351,002 toneladas en 2020, mientras que entre el período 2017-2018 mantuvo una tasa del 6% anual y desde el 2019 ha mantenido un crecimiento del 2% (Vázquez-Vera y Chávez-Carreño, 2022).

La producción de peces de aleta ha representado el 90.2% de la producción acuícola a nivel mundial, y se prevé que la producción mundial de pescado aumente a 200 millones de toneladas para el 2029 (OCDE/FAO, 2020). En México aporta alrededor de 60,000 toneladas al año, siendo la tilapia (*Oreochromis* sp.) la segunda mayor especie en producción (FAO, 2020).

La nutrición es considerada uno de los elementos indispensables en la acuicultura, y uno de los aspectos más importantes, es el aporte proteico (Uscanga-Martínez *et al.*, 2011). Existen múltiples fuentes proteicas, pero la más utilizada en nutrición acuícola es la harina de pescado, cuya demanda a menudo es asociada a impactos ecológicos negativos, además de ser escasa y costosa (Graü De Marín *et al.*, 2007). La alta demanda de la harina de pescado ha propiciado a que sus costos incrementen. En México los precios fluctúan alrededor de \$ 31.754/Ton (World Bank, 2022), y se pronostica que el precio siga en constante aumento (OCDE/FAO, 2020). Por tal motivo, los investigadores científicos se han dado a la tarea de buscar otras fuentes de proteínas alternas, que sustituyan de manera parcial o completa la harina de pescado por proteínas vegetales, de vertebrados terrestres, de invertebrados, unicelulares y descartes de pescados (Kirimi *et al.*, 2016; El-Sayed,



1999). Las proteínas unicelulares, son un grupo que ha sido de interés en los últimos años, ya que tienen la ventaja de ser económicas, y mantener un crecimiento y desarrollo corporal adecuado, actualmente se evalúa su inclusión como ingredientes alternativos en los alimentos balanceados de la acuicultura (Matassa *et al.*, 2016; Gamboa-Delgado *et al.*, 2017; Hülsen *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2021). Sin embargo, el uso de biomásas microbianas en la tilapia es reciente, por lo que el estudiar el efecto nutricional sobre el desempeño de los peces es un gran paso para la elaboración de nuevas dietas. En los últimos años, se han realizado diversos análisis que nos ayudan a conocer la eficiencia y calidad de la proteína, entre los más mencionados se encuentran los marcadores indigeribles que evalúan la pérdida excretora (NRC, 2011). Otra técnica es mediante la determinación de la composición elemental de los alimentos ingeridos en los diferentes segmentos del tracto digestivo (Barreto-Curiel *et al.*, 2018); sin embargo, éstos solo se basan en el análisis intestinal, es decir, solamente reflejan lo que los peces ingieren y no lo que asimilan.

El análisis de isótopos estables, (SIA por sus siglas en inglés Stable Isotope Analysis) es una herramienta que ayuda a conocer cómo se asimilan los componentes nutricionales en la dieta (Gamboa-Delgado *et al.*, 2022). En el presente trabajo se evaluó la incorporación de la proteína al crecimiento de la tilapia del Nilo, así como la contribución de carbono estructural al crecimiento, mediante el uso de una metodología basada en la determinación de valores isotópicos ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ). Por otro lado, los sistemas acuáticos son los principales receptores de las descargas antropogénicas (Costa *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2014). Se conoce que, contaminantes en el agua como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), ocasionan daños en los sistemas de producción acuícola (Nogueira *et al.*, 2011). Asimismo, la tilapia posee mecanismos innatos que activan respuestas enzimáticas ante la presencia de xenobióticos, conocidos como “biomarcadores de medición de daño” (Holth *et al.*, 2014). En el presente estudio se utilizaron los biomarcadores enzimáticos (CE), (GST) y (ALP) para identificar posibles efectos de protección hepática conferida por las dietas en tilapias expuestas a diésel. Adicionalmente, se ejecutó un análisis de metagenómica empleando muestras de ADN del tejido intestinal a través de secuenciación (NGS, por sus siglas en inglés) para conocer los cambios en la biota bacteriana de la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) en función de las diferentes dietas otorgadas.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 ACUACULTURA**

La acuicultura es definida como el cultivo de organismos acuáticos (peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas), en donde se encuentra implicada la intervención humana (FAO, 2022). La actividad acuícola es conocida por producir alimentos de alta calidad con un impacto ambiental potencialmente bajo. Actualmente es el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento, con una producción total de 122.6 millones de toneladas en el año 2020. A comparación del año 2018 donde la producción acuícola total a nivel mundial alcanzó 179 millones de toneladas en la producción de pescado, de los cuales 22 millones de toneladas se destinó para la producción de aceite y harina de pescado (OECD/FAO, 2020). Para el año 2019 el sector mundial de la pesca y la acuicultura disminuyó con respecto al año 2018. Sin embargo, la producción acuícola mantiene un crecimiento del 2%, mientras que la pesca disminuyó cerca del 4% (OECD/FAO, 2020).

Entre el 2016-2018, México registró un crecimiento con una tasa de 6% anual (Vázquez-Vera y Chávez-Carreño, 2022), de acuerdo con los registros de CONAPESCA (2022), en el año 2021 se tuvo una producción de 1.9 millones de toneladas, (5.3% mayor) que el año anterior. México ocupa el vigésimo lugar a nivel mundial, y se prevé que su crecimiento entre el 2020 y el 2030 sea del 6.2% en la producción acuícola (FAO, 2022). Dado que la producción de alimentos acuáticos podría tener un aumento del 13% debido a la expansión de la producción acuícola sostenible, se estableció como meta lograr el crecimiento en 15.5% en la producción pesquera y acuícola del país para el 2024 (CONAPESCA, 2022).

### **2.2 CULTIVO DE LA TILAPIA DEL NILO**

Para la acuicultura en México, el cultivo de la tilapia del Nilo ha tenido un aporte comercial muy importante en los últimos años, al ser la segunda especie con mayor producción después del camarón a nivel mundial (FAO, 2020; Vázquez-Vera y Chávez-Carreño, 2022). En México se ha registrado una producción acuícola de alrededor de 45, 064 Ton (en peso vivo) para el año 2021 (en sistemas controlados) comparado con el 2020

donde se tuvo una producción mayor a 96, 977 ton (peso vivo), lo que corresponde a un 54% menos de la producción, causada por la situación pandémica que se vivió en ese año (CONAPESCA, 2021). De este modo, la tilapia ocupa el 5° lugar en producción a nivel nacional. Sin embargo, en el año 2021 se generó un valor comercial de dos mil 66.43 millones de pesos, donde Chiapas representa uno de los principales Estados que generan mayor aporte, seguido de Nayarit y Jalisco (Vázquez-Vera y Chávez-Carreño, 2022; Martínez-Porcha *et al.*, 2023). La tasa media de crecimiento anual de producción de tilapia en los últimos 10 años fue de 9.1% (CONAPESCA, 2018).

La tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), es un invertebrado teleosteo del orden Perciforme perteneciente a la familia de los Cichlidae, originario de África. Es conocido por alcanzar una conversión alimenticia favorable. Presenta un crecimiento rápido, masa muscular alta, resistencia a enfermedades, coloración y textura adecuada.

En México la tilapia fue introducida en 1964 (NICOVITA, 2010; INAPESCA, 2018). Se caracteriza por ser un organismo euritermo, que logra habitar en cuerpos de agua de zonas tropicales con temperaturas entre los 25°C y 34°C, oxígeno mayor a 5 mg/l, pH de 6 a 8, amonio menor a 0.25 mg/l, alcalinidad y dureza entre 80 y 200 mg/l de CaCO<sub>3</sub> y transparencia de 25 cm. Los machos pueden alcanzar 60 cm de longitud total y un peso de 5 kg, por lo que son los mejores en obtener más masa muscular. Las hembras logran un peso entre los 600 g y 1000 g (NICOVITA, 2010; Urías Sotomayor *et al.*, 2022).

La densidad de siembra de cultivo de la tilapia depende del sistema de cultivo. El manejo de la calidad del agua es un componente necesario en todos los sistemas (extensivo, semi-intensivo, intensivo e hiper-intensivo). En el nivel intensivo, el sistema de producción busca una elevada producción en el menor espacio y de la manera más rápida posible, logrando una conversión de producción de tilapia en jaula entre 1.8:1 y 2.3:1. Por el contrario, con el sistema extensivo, la producción suele ser entre 4,000 y 10, 000 kg/ha/año, logrando un factor de conversión de 1- 1.4 (NICOVITA, 2010; López-Tellez *et al.*, 2022; Vázquez-Vera y Chávez-Carreño, 2022).

### 2.2.1 TAXONOMÍA

La tilapia del Nilo (*O. niloticus*), también conocida como tilapia plateada y roja, es una especie de pez de la familia Cichlidae, que habita en climas tropicales (CONABIO, 2014).

**Reino:** Animalia

**Filo:** Chordata

**Clase:** Teleostei

**Orden:** Cichliformes

**Familia:** Cichlidae

**Subfamilia:** Pseudocrenilabrinae

**Género:** *Oreochromis*

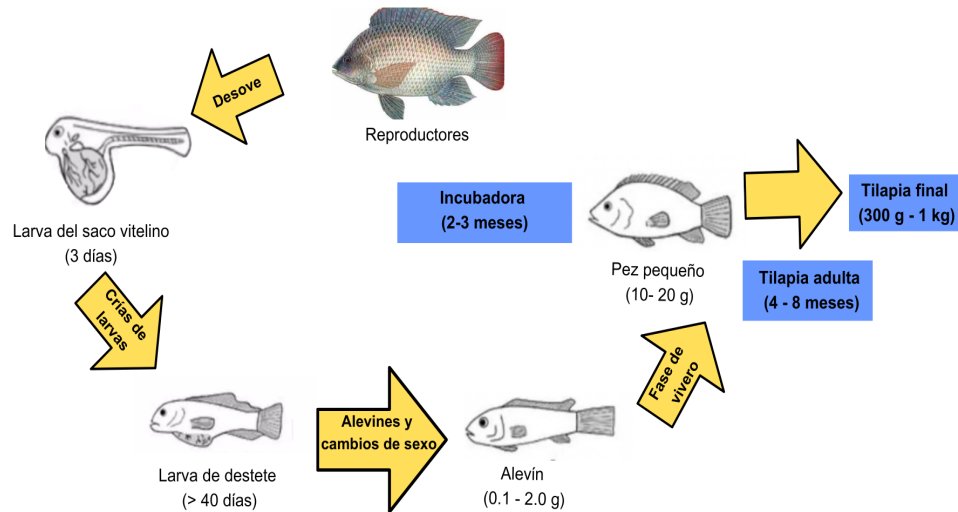
**Especie:** *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

### 2.2.2 REQUERIMIENTOS DE LA TILAPIA

La alimentación de los peces representa del 40 al 60% del costo en un sistema intensivo (Rahman *et al.*, 2012; Kimiri *et al.*, 2016), de ahí la importancia de buscar nuevos ingredientes con la cantidad precisa de nutrientes. El requerimiento total de proteínas se encuentra influenciado por la especie, digestibilidad, ración alimenticia, composición de la dieta (perfil de aminoácidos), etapa de crecimiento (Figura 1), y otros factores externos, como la temperatura, calidad de agua y otros parámetros fisicoquímicos. Esto exige la búsqueda constante de la proteína ideal en la dieta (Torres-Novoa y Hurtado-Nery, 2012; Wing-Keong y Romano, 2013; Miles y Chapman, 2020). Para ello es importante considerar el sistema de cultivo (extensivo, semi-intensivo e intensivo) que se está empleando para la producción de la tilapia (NICOVITA, 2010).

En las dietas comerciales la cantidad de proteína en peces es elevada debido, a que se conoce que los peces tropicales crecen más rápido y de esa forma demandan más proteína, sin embargo, los organismos que se encuentran en crecimiento necesitan aún más proteína.

(Miles y Chapman, 2020). Por lo que lograr la proteína ideal, consiste en lograr que los aminoácidos dietéticos sean incorporados en la dieta en las proporciones que requiere el animal (Wing-Keong y Romano, 2013).



**Figura 1.** Ciclo de cultivo de la tilapia desde la reproducción hasta la venta al mercado. El contenido nutricional de la dieta y la alimentación influirán en la duración de cada etapa. (Adaptado por: Wing-Keong y Romano, 2013).

Los requerimientos nutricionales de la tilapia del Nilo se encuentran establecidos en el NRC (2011), donde Orachunwong y colaboradores (2001), han reportado formulaciones alimenticias para tilapia, de menor costo, que ayudan a la fabricación de alimentos (Tabla 1). Los nutrientes pueden clasificarse en cinco diferentes grupos: proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales.

En las diferentes fuentes alternativas de proteínas se encontrarán deficiencias en algunos aminoácidos, por lo que la suplementación con aminoácidos sintéticos, y otros nutrientes será necesaria para lograr una productividad óptima (Uscanga-Martínez *et al.*, 2011; Wing-Keong y Romano, 2013). Un ejemplo es en las hembras reproductoras y alevines de tilapia que requieren alrededor del 30-40% más proteína que los peces pequeños, mientras que para la etapa de crecimiento necesitan entre un 20-30% (Wing-Keong y Romano, 2013).

**Tabla 1.** Formulaciones alimenticias para tilapia (*Oreochromis niloticus*) para la diferentes etapas de crecimiento (Wing-Keong y Romano, 2013).

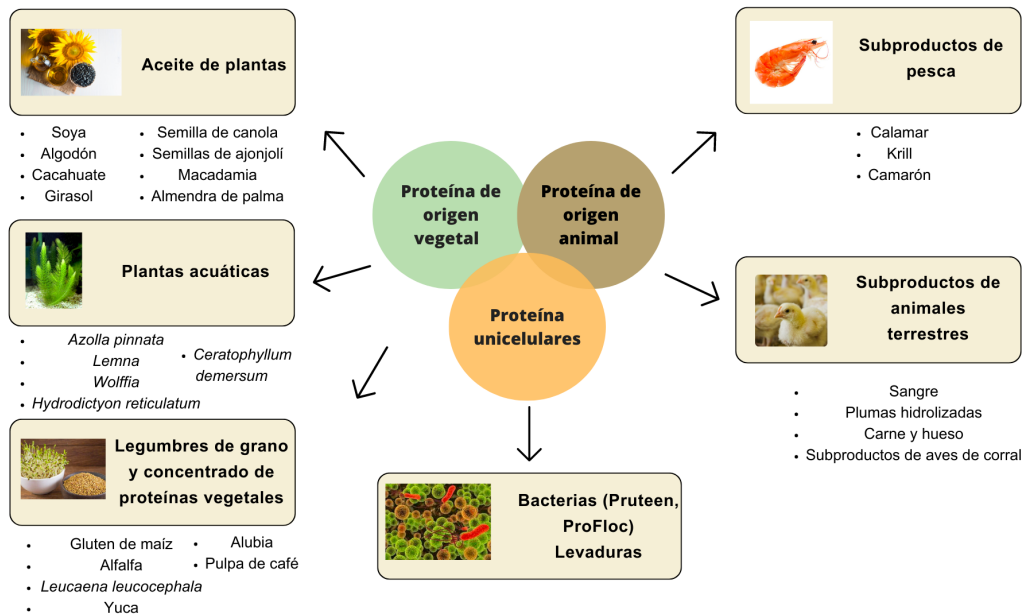
Limitaciones	Restricciones (%)	Pre-iniciador	Iniciador	Crecimiento	Finalización
Proteína cruda	Min	40	30	25	20
Grasa cruda	Min	4	4	4	4
Fibra cruda	Max	4	4	6	8
Ácidos grasos (Omega-3)	Min	0.50	0.50	0.50	0.50
Ácidos grasos (Omega-6)	Min	0.50	0.50	0.50	0.50
Energía digestible (Kcal/kg <sup>-1</sup> )	Min	2800	2800	2800	2800
Mezcla de vitaminas y minerales	Mezcla	2	2	2	2

### 2.3 ALIMENTACIÓN DE LA TILAPIA Y EL USO PROTEINAS ALTERNATIVAS

La nutrición de la tilapia del Nilo es un aspecto muy importante en la producción acuícola, ya que esta especie es considerada como la tercera especie con mayor diversificación geográfica a nivel mundial (FAO, 2022), así como por ser un factor determinante en el éxito del crecimiento (Kimiri *et al.*, 2016). En los 10 años recientes, su producción ha mantenido un crecimiento del 7% anual (FAO, 2020), con una producción mundial de 4 407. 2 toneladas (peso vivo) en 2020 (FAO, 2022) y a nivel nacional de 77, 245 toneladas totales en 2021 (CONAPESCA, 2021).

En las formulaciones para dietas orientadas a tilapia cultivada, la harina de pescado se utiliza como ingrediente principal, debido a las propiedades nutricionales que ofrece como: su alto contenido proteico, palatabilidad, digestibilidad y el perfil adecuado de aminoácidos (Uscanga-Martínez *et al.*, 2011; Kimiri *et al.*, 2016). Sin embargo, los precios de la harina de pescado han ido incrementado en los últimos años, debido a la demanda que este genera al ser utilizado en otros sectores (9% cría de cerdos, 4% animales de compañía, 1% avicultura). Cabe señalar que de acuerdo con la Organización de Ingredientes Marinos (IFFO, 2020), alrededor del 86% de la producción de harina de pescado aún es utilizada para la acuicultura (FAO, 2022). Por otra parte, se prevé que los costos para el año 2029 se encuentren alrededor de 1,676.9 USD/t, debido al incremento del consumo (5, 874.7 Mt) comparada con el consumo del 2022 donde se estimó un registro de 5,236.6 Mt (OECD/FAO,2020).

Varios estudios demuestran que la nutrición de los peces es uno de los aspectos en los cuales la industria acuícola se enfoca a fin de reducir sus costos y su factor de impacto ambiental. Se conoce que los precios más altos los constituyen las proteínas de origen animal, en comparación con las de origen vegetal, las cuales sustituyen de manera parcial o completa la harina de pescado al incorporar nuevos ingredientes provenientes de diferentes fuentes proteicas (Figura 2). Sin embargo, las harinas vegetales tienen la desventaja de ser deficientes en lisina y metionina. La tilapia ha demostrado ser capaz de tolerar ciertos porcentajes de sustitución en su dieta (El-Sayed, 1999). Sin embargo, las fuentes dietéticas alternativas a la harina de pescado han demostrado ser deficientes en minerales y aminoácidos, y esto conlleva a tener un menor crecimiento, rendimiento y, por ende, aumenta la susceptibilidad a la presencia de enfermedades (Uscanga-Martínez, *et al.*, 2011). Generalmente, los problemas de salud en los cultivos se encuentran relacionados al estrés de los peces ocasionado por factores ambientales (exposición a contaminantes, aire, manipulación, transporte u otros estresores). Las bacterias son los agentes causales más frecuentes de enfermedades en cultivos intensivos y en ambientes dulceacuícolas, donde destacan las *Aeromonas spp*, *Mycobacterium spp*, *Pseudomonas spp*; entre otras (Ortega Asencios, 2011).



**Figura 2.** Proteínas alternativas a la harina de pescado para la tilapia (*Oreochromis niloticus*). Basado en: El-Sayed (1999).

## 2.4 PROTEINAS UNICELULARES

Dentro de los sistemas de cultivo intensivo y semi-intensivo en la producción acuícola, la utilización de la proteína unicelular ha traído la atención de los científicos en los últimos años, al representar una fuente de proteína de bajo impacto ambiental, económica y nutritiva, comparada con la harina de pescado. El término proteína unicelular (single cell protein, SCP, por sus siglas en inglés) fue acuñado en 1966 por Carol L. Wilson en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (Suman *et al.*, 2015). El término se refiere tanto a las llamadas bioproteínas, proteínas microbianas, como a la biomasa microbiana obtenida a partir de diversos grupos de microorganismos (células secas) procedentes de organismos heterótrofos y autótrofos. Algas unicelulares, hongos, cianobacterias, bacterias y levaduras han sido utilizadas para producir biomasa ya sea mediante fermentadores o fotobioreactores (El-Sayed, 1999; Gamboa-Delgado *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021).



#### 2.4.1 *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

La *Arthrospira platensis*, es una cianobacteria multicelular y filamentosa, también conocida como algas verde-azules. Son organismos procariotas que se encuentra en aguas tropicales y salinas con un pH alcalino (9.5), su pared celular contiene polisacáridos (peptidoglucano) que tiene una digestibilidad del 86% y su capa es de aproximadamente 40-60 nm. Su nivel de producción es muy alto (25 ton ha<sup>-1</sup>/año ó 15 ton proteína ha<sup>-1</sup>/año), ya que permite que su biomasa se duplique cada 3° a 5° día (Vonshak, 2002; Silva-Neto *et al.*, 2012; Soni *et al.*, 2017). Por ende, es utilizada como fuente de proteína de origen vegetal en los alimentos acuáticos, al ser un producto natural para los peces y crustáceos. Tiene un alto contenido en macro y micronutrientes, hierro (3.73 mg/g MS), vitamina B12 y β-caroteno (20 veces más que la zanahoria), clorofila, ficocianina, antioxidantes (Pakravan *et al.*, 2017; Plaza *et al.*, 2018; Darwish *et al.*, 2020), ácido alfa-linolénico (ALA) (0.12%) y ácidos grasos (ω3 y ω6). Se ha observado que el ω3, inhibe el estrés en perros, por lo que su utilización en este estudio podría cambiar la capacidad de respuesta ante la exposición a un estresor (diésel). También se conoce que las microalgas contienen compuestos biológicamente activos como el grupo fenol (15.4 mg/g de alga seca), lo que poseen actividades cancerígenas, antiinflamatorias y anti-aterosclerosis (Bin Dohaish *et al.*, 2018). Asimismo, los sistemas acuícolas intensivos y semi-intensivos, producen la acumulación de compuestos tóxicos, como el amoníaco (NH<sub>3</sub>), generando efectos nocivos en la salud de los peces y crustáceos, por lo que la implementación de esta cianobacteria podría ayudar a los organismos en cultivo a tolerar factores ambientales adversos (Pakravan *et al.*, 2017). Su contenido proteico se encuentra alrededor de (60 - 70%) (Macias-Sancho *et al.*, 2014) y el de aminoácidos alrededor del (47%) del peso total de la proteína (Soni *et al.*, 2017).

La tilapia es una especie conocida por cambiar su dieta de carnívoro a omnívoro, debido a que durante la etapa larvaria es capaz de alimentarse de pequeños invertebrados, mientras que durante su etapa adulta su alimentación se encuentra compuesta por algas, fitoplancton, entre otros alimentos; esto se puede deber a la formación completa del tracto digestivo, sin embargo, en estudios previos se ha demostrado que al implementar Spirulina

el contenido de ácido gástrico en la etapa larvaria aumentó después de las 20 h de alimentación (Lu *et al.*, 2004).

En investigaciones previas, Velásquez y colaboradores (2016) demostraron que al incorporar 30% de *A. platensis* junto con la harina de pescado mejoró considerablemente el crecimiento, la eficiencia de la utilización del alimento y la salud en la tilapia. Al mismo tiempo, también ha sido utilizada para reemplazar parcialmente la harina de pescado en la dieta del camarón blanco (Macias-Sancho *et al.*, 2014).

Anteriormente, la *A. platensis* mejoró el sistema inmunológico, promovió el crecimiento y presentó efectos antioxidantes con 0.5, 1 y 2% de inclusión dietaria (Abdel-Tawwab y Ahmad, 2009a), y en un estudio por Plaza *et al.* (2018) la tilapia *Oreochromis niloticus* se expuso a hipoxia para conocer la respuesta bajo la implementación de *A. platensis*.

#### **2.4.2 EJEMPLOS DE BIOMASAS MICROBIANAS**

Dentro de las biomasas microbianas existen bacterias que pueden utilizar medios de cultivo no convencionales para multiplicarse (desechos agrícolas, metano, entre otros) (Wen, 2018). Estas biomasas presentan un alto potencial, al ser capaces de reemplazar la harina de pescado o de soya, sin generar efectos adversos en la alimentación para animales acuáticos (Gamboa-Delgado *et al.*, 2022). En un estudio realizado por Yossa *et al.* (2021), se aplicó una levadura (DY-Pro) en dietas para tilapia del Nilo, en las cuales se manejaron diferentes porcentajes de inclusión abarcando desde el 2% hasta el 100%, donde descubrieron que mejoró la alimentación y la utilización de los nutrientes, sin afectar la salud del animal, logrando reemplazar la harina de pescado hasta el 100%.

Entre algunas características de la proteína unicelular se conoce que algunas especies de microorganismos tienen un alto contenido proteico (60-82% MS) muy similar a la harina de pescado, igualmente proporciona aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, vitaminas y minerales. Sin embargo, al comparar las proteínas unicelulares provenientes de algas y hongos, las derivadas de origen bacteriano contienen un mayor contenido de metionina (3%), proporcionando un mejor crecimiento (Xu *et al.*, 2021). Otra ventaja, es que su producción es muy rápida. Por ejemplo, se estima que, en 1 día de crecimiento de

un bovino de 500 kg, se produce 1 kg de proteína, mientras que 500 kg de levadura producirían varias toneladas de proteína en un día, en comparación con la producción de soya y de maíz, donde su rendimiento es menor.

Las bacterias han sido utilizadas para tratar aguas residuales, ayudando a eliminar el nitrógeno y fósforo (Hülse *et al.*, 2019). También se utilizan para la elaboración de alimentos al fermentar la masa para la elaboración de pan y queso, ayudando a mantener una preservación duradera (Matassa *et al.*, 2016).

En el contexto de la producción industrial de biomasa bacteriana, la empresa Nutrinsic<sup>®</sup>, desarrolló una biomasa a base de un consorcio de bacterias ubicuas conocida de manera comercial como ProFloc<sup>™</sup>. La producción de esta biomasa ocurre en los efluentes de las instalaciones de tratamiento de agua que se dedican a la producción de bebidas y alimentos. Proceso donde se administra una cantidad de bacterias no perjudiciales para la salud que ayudan a la producción de estas mismas. Para su proceso se emplean nutrientes y aireación; de esta manera mediante la implementación de controles operativos y factores de crecimiento, se produce agua limpia, generando así la proteína bacteriana con un 65% PC. Para su obtención las células se deshidratan mecánicamente, luego se secan e inactivan y posteriormente se almacenan, para ser entregadas como ingredientes en la alimentación animal. Se considera que el proceso de su elaboración conlleva a una disminución de la huella de carbono, en comparación a la producción de otras fuentes de proteína (OBERON, 2010). Gamboa-Delgado *et al.* (2020) evaluaron el crecimiento y la asimilación del nitrógeno en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* al incorporar 100% ProFloc<sup>™</sup> (BM) y 4% BM combinado con harina de calamar y pescado, logrando una mejor ganancia de peso en los camarones alimentados con 4% BM, comparado con los que recibieron 100% de harina de pescado. Por lo que se demuestra que la utilización de una harina a base de bacterias podría lograr una mejor palatabilidad y un mejor rendimiento comparada con la harina de pescado, disminuyendo el impacto ambiental.

## 2.5 ANÁLISIS PROTEICO (LA DIGESTIBILIDAD Y LA ASIMILACIÓN COMO INDICADORES DE DESEMPEÑO NUTRICIONAL)

La digestibilidad es uno de los principales criterios de calidad nutricional, y en el caso de las proteínas nos permite conocer el potencial alimenticio (Guillin *et al.*, 2023). El principal propósito de la proteína en las dietas balanceadas es incrementar la masa muscular y la supervivencia de los organismos acuáticos en el menor tiempo posible, obteniendo una disminución de los costos de producción (Uscanga-Martínez *et al.*, 2011). La formulación de las dietas se basa en los análisis proximales de los ingredientes y posteriormente se obtiene la manufactura de las dietas, permitiendo la elaboración de acuerdo con la capacidad digestiva de los organismos, la cual a su vez está influida por la especie, etapa de vida, tipo de cultivo, etc.

De esa misma manera, su aprovechamiento proteico se basa en la medición de pérdidas digestivas de nitrógeno y aminoácidos (Guillin *et al.*, 2023). Los nutrientes suministrados por los diferentes ingredientes incorporados en la dieta se pueden determinar mediante diferentes métodos de asimilación, donde se clasifica en directos e indirectos. Un método indirecto es mediante el uso de marcadores no absorbibles, indigeribles y recuperables. Entre ellos se encuentran el óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) o las cenizas insolubles en ácido (Uscanga-Martínez *et al.*, 2011; Guillin *et al.*, 2023). Sin embargo, el uso de estos marcadores presenta algunas desventajas, como la interacción de los componentes de la dieta con el marcador no absorbible, el lento crecimiento de los organismos y la dificultad de recolectar las heces en medio acuático, lo cual en la producción acuícola es complicado y erróneo. No obstante, para la obtención de las heces existen diferentes métodos entre ellos se encuentra el establecido por Cho *et al.* (1982), quienes utilizaron una columna de sedimentación para separar las heces del agua del efluente (Cho *et al.*, 1982). Otras opciones son las descritas por Choubert *et al.* (1979), quien utilizó una pantalla de rotación mecánica para filtrar el material fecal, así como la de Smith (1971) quién encerró a los peces en cámaras metabólicas para posteriormente recolectar las heces (Cho *et al.*, 1982). Estas técnicas se han implementado en investigaciones previas como la de Fanizza *et al.* (2023).

Otro método indirecto es mediante la calorimetría, en el que se requiere la medición de la ingesta de alimentos y de las pérdidas fecales y otros desechos para permitir que la energía se divida sobre la base de ingesta de energía digerible o metabólica (Cho *et al.*, 1982; Bordner *et al.*, 1983).

Entre los métodos directos se encuentra la técnica que muestrea las diferentes partes anatómicas del tracto digestivo. Sin embargo, este método consume mucho tiempo y no ayuda a conocer la asimilación de los nutrientes sino lo que los peces ingieren (Bordner *et al.*, 1983; Barreto-Curiel *et al.*, 2018). Por otro lado, se encuentran los métodos “in vitro”, como el multienzimático descrito por Dufour-Etienne *et al.* (1992). Asimismo, el uso de pH constantes y diferentes cantidades (una, dos o tres) de enzimas (Tonglet *et al.*, 2001).

### **2.5.1 MARCADORES ISOTÓPICOS**

Las técnicas isotópicas surgieron a base de las ciencias geológicas, pero están siendo utilizadas recientemente en nutrición y ecología (Santiago *et al.*, 2005; Gaye-Siessengger *et al.*, 2007; Gamboa-Delgado y Márquez-Reyes, 2018). Estudios previos basados en estas técnicas han facilitado el estudio de la nutrición animal de organismos acuáticos. Mediante el análisis de isótopos estables encontrados abundancia natural en el tejido del organismo y en los elementos dietarios consumidos, es posible realizar estimaciones directas de los flujos de carbono ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ) y sus respectivos isótopos. Los valores isotópicos son reportados en notación delta como  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  (Santiago *et al.*, 2005; Fetahi *et al.*, 2018; Gamboa-Delgado *et al.*, 2020).

La aplicación de los métodos isotópicos se basa en el hecho de que la composición isotópica de los tejidos (músculo) en los organismos se asemeja a la de sus dietas. Durante los procesos enzimáticos, las formas isotópicas ligeras suelen excretarse, mientras que las formas isotópicas pesadas suelen retenerse en el organismo. De esa manera, a la diferencia isotópica entre organismo y la dieta se le conoce como discriminación o cambio trófico (Gaye-Siessengger *et al.*, 2007; Quintino-Rivera, 2022).

Las firmas isotópicas ayudan a conocer lo que un organismo ha consumido (reconstrucción dietaria). Por ende, en animales mantenidos bajo condiciones controladas, es posible conocer las fuentes dietéticas que aportan nutrientes para el crecimiento, y el tiempo que éste tarda en asimilarlas (Fry, 2006).

Las metodologías isotópicas también se han utilizado en la investigación acuícola para estimar la contribución relativa de diferentes fuentes de dieta al crecimiento de los peces, mediante modelos de balance de masas o modelos de mezcla isotópica (Philips y Gregg, 2001). Estos modelos consideran el valor isotópico de los elementos de la dieta y del animal consumidor. Adicionalmente, con la información de cambios isotópico en el tiempo, es posible estimar indirectamente la tasa de recambio metabólico del carbono o nitrógeno en algún tejido o en el animal consumidor completo (Hesslein *et al.*, 1993). Estudios en donde se aplicaron modelos de mezclado con dos fuentes dietarias, han permitido estimar los porcentajes de asimilación de ingredientes experimentales al compararlos con la harina de pescado, (Philips y Gregg, 2001; Fry, 2006; Zhou y Gu, 2020).

Zhou y Gu (2020), evaluaron la incorporación de harina de soya en la dieta de tilapia del Nilo con respecto a la harina de pescado mediante la información isotópica de C y N, obteniendo que los peces alimentados con dietas experimentales disminuyeron con el aumento del contenido de harina de soya, excepto los  $\delta^{15}\text{N}$  de los peces alimentados con el 25% de harina de pescado.

El constante estudio de diferentes fuentes proteicas mediante técnicas analíticas contribuirá al fomento de un mayor aporte de nutrientes alternativos en las fórmulas alimenticias para la nutrición acuícola.

## **2.6 BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS DEL HÍGADO**

Los sistemas acuáticos son los principales receptores de las descargas antropogénicas (Costa *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2014). En el año 2010, debido a la explosión de una plataforma petrolera, situada en el Golfo de México, se ocasionaron

graves daños en los ecosistemas marinos y en las producciones acuícolas (Cable New Network, 2021).

La harina de pescado es considerada un ingrediente esencial en la dieta de la tilapia. La creciente demanda de su uso ha impulsado la búsqueda de nuevos ingredientes proteicos más baratos, sostenibles y aptos para contrarrestar contaminantes ambientales (Miles y Chapman, 2007; Khafaga *et al.*, 2020).

La *Arthrospira platensis*, se ha utilizado como aditivo en la alimentación para la tilapia, por su composición nutrimental y efectos antioxidantes (Velásquez *et al.*, 2016; Khalila *et al.*, 2018; Mahmound *et al.*, 2018; Plaza *et al.*, 2018; Siringe *et al.*, 2021). Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto protector de este aditivo ante la exposición a contaminantes en peces. En estudios previos, Abdel-Tawwab y Ahmad (2009a) encontraron que la adición al 0.5% y 2% de *Arthrospira platensis* en dietas para *O. niloticus*, mejoró el sistema inmunológico.

Por otro lado, aditivos como las proteínas unicelulares o proteínas microbianas, entre ellas el ProFloc™, se han utilizado en dietas para peces por sus beneficios como estimulantes del sistema inmunológico, debido a la presencia de la coenzima Q10 (CoQ10) que no se encuentra en la harina de pescado (Gamboa-Delgado y Márquez-Reyes, 2018; Hülsen *et al.*, 2019). Por lo anterior es recomendable realizar estudios que evalúen el uso de estos ingredientes en dietas para peces y su posible efecto en la aminoración de los efectos de estrés enzimático provocado por contaminantes como los hidrocarburos.

Se conoce que contaminantes en el agua, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), pueden ocasionar lesiones en hígado, branquias e incluso alterar el ADN formando aductos de HAP-ADN, originando cáncer en organismos acuáticos.

Además, pueden alterar la actividad de enzimas hepáticas de biotransformación de xenobióticos (Nogueira *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2014) como las del citocromo P450 (CYP450), (Han *et al.*, 2014; Holth *et al.*, 2014). Estas respuestas enzimáticas en los vertebrados a nivel molecular por exposición a contaminantes son comúnmente utilizadas como biomarcadores de exposición, por ende, los biomarcadores son herramientas

valiosas que ayudan a conocer la gravedad de los efectos de la contaminación de los ecosistemas acuáticos.

La actividad de diversas enzimas en peces ha sido utilizada como herramienta de biomarcador y diagnóstico de la contaminación (Costa *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2013). Dentro del sistema enzimático del CYP1A se encuentran enzimas de fase I, que incluye a la Carboxilesterasa (CE) y enzimas de fase II, la Glutathion S-transferasa (GST), que incrementan su actividad en respuesta a la presencia de compuestos xenobióticos. Otras enzimas son utilizadas como biomarcadores de daño hepático, siendo una de las principales la Fosfatasa Alcalina (ALP).

Algunos estudios demuestran el potencial de la GST como biomarcador de exposición a diversos xenobióticos, tal es el caso de HAPs (benzopireno) en tilapia del Nilo, que desencadenó una respuesta en hígado de actividad GST por efecto de la exposición (Costa *et al.*, 2011). Otro caso, es el estudio realizado con el pez catán (*Atractosteus spatula*) en el que los peces expuestos a B-naphthoflavone, diazinón y estradiol (E2) registraron una variación en la actividad de enzimas como ALP, GST y CE (González *et al.*, 2015). En otro estudio realizado en el Río Mississippi se pudo observar una respuesta en la actividad de CE en presencia de metales pesados, hexaclorobenceno (HCB) y hexaclorobutadieno (HCBd) en hígado en un catán pinto (*Lepisosteus oculatus*) (Huang *et al.*, 1997).

Debido a los efectos de la contaminación en los organismos de cultivo, se han realizado estudios para evaluar diferentes aditivos en dietas para acuicultura como es el caso de García-Pérez *et al.* (2020) donde se registró menor daño hepático a camarones (*Litopenaeus vannamei*) cuando las dietas incluían ácido linoleico conjugado y curcumina.

## **2.7 COMUNIDADES BACTERIANAS EN *OREOCHROMIS NILOTICUS***

Los peces poseen un sistema inmunológico innato y adaptativo, donde la epidermis, escamas y mucosas actúan como primera barrera de defensa, debido a que las branquias y el tracto gastrointestinal son la principal vía de entrada de patógenos (Wu *et al.*, 2021). Se ha descrito también, que la glicoproteína del corión es muy apta para la adhesión y



colonización bacteriana (Merrifield y Rodiles, 2015; Martínez-Porcha *et al.*, 2023). La epibiota es una comunidad microbiana presente en el embrión que contiene bacterias que ayudan al desarrollo inmunológico temprano del pez contra patógenos (Merrifield y Rodiles, 2015).

En tilapia, una de las especies de mayor cultivo, la prevalencia de estreptococos ha llevado a altas pérdidas económicas, al igual que otros factores, como los cambios de temperatura, salinidad, cautividad y dieta (Zheng *et al.*, 2020; Bereded *et al.*, 2021). En un estudio reciente se reportó que la temperatura del agua afectó la composición de las bacterias ácidolácticas intestinales (ALI) (Bareded *et al.*, 2021). Se sabe que el microbioma intestinal de los vertebrados mejora y estimula el sistema inmunológico, debido a que este se encuentra ligado al tejido linfoide (Gonçalves *et al.*, 2017), además de facilitar la obtención de nutrientes y energía mediante la fermentación de componentes dietéticos no digeribles en el intestino (Trushenski, 2015). Las comunidades bacterianas, antagonizan a los patógenos oportunistas (Zheng *et al.*, 2020) y tienen como función la síntesis y/o absorción de vitaminas y minerales, al igual que se ha demostrado que participan en la morfología intestinal (Bareded *et al.*, 2020, 2021).

Los microorganismos que habitan en la microbiota intestinal (entre ellos se encuentran las bacterias, arqueas, levaduras y hongos) liberan metabolitos para comunicarse con el huésped e incrementar la respuesta inmune (Martínez-Porcha *et al.*, 2023). Se conoce que el tracto digestivo de la tilapia del Nilo se encuentra principalmente poblado por anaerobios estrictos.

La aplicación de enfoques moleculares basados en la diversidad de secuencias del gen del ARN ribosómico 16S ayuda a la identificación de aislamientos para caracterizar la composición de las comunidades bacterianas en abundancias relativas (Merrifield y Rodiles, 2015; Bereded *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). Entre los principales Filos reportados se encuentran Proteobacteria, como el más dominante, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria* y *Crenachaeorta* (Martínez-Porcha *et al.*, 2023).

Wu y colaboradores (2020) realizaron un estudio en el que emplearon una cepa estándar interna como método de cuantificación absoluta, y de esta manera pudieron conocer la abundancia relativa y absoluta de la comunidad bacteriana intestinal en la tilapia, que estuvo dominada por *Cetobacterium*, *Plesiomonas*, *Romboutsia* y *Escherichia-Shigella*

En otro estudio realizado con la tilapia híbrida cultivada (NEW GIFT por sus siglas en inglés), se encontró *Unidobacterium*, *Crenothrix* y *Cetobacterium* entre la microbiota beneficiosa (Wu *et al.*, 2021), mientras que entre los principales patógenos intestinales se encontraron las *Aeromonas* y *Streptococcus*, además de *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Escherichia-Shigella*, *Paeniclostridium*, *Aeromonas*, y *Clostridium sensu stricto* 1 (Wu *et al.*, 2020, 2021).

Sin embargo, las comunidades bacterianas pueden variar, de acuerdo con los factores ambientales, nutricionales o la especie (Huang *et al.*, 2023). En los peces herbívoros se ha reportado mayor presencia de la bacteria *Firmicutes* y en peces carnívoros, bacterias del grupo *Proteobacterias* (Martínez-Porchas *et al.*, 2023).

### **2.7.1 EFECTOS NUTRICIONALES EN LA MUCOSA DE LOS PECES**

La microbiota gastrointestinal mantiene una relación compleja y dinámica entre las poblaciones bacterianas en el intestino de vertebrados acuáticos en equilibrio, a lo que se conoce como eubiosis. Cuando este equilibrio se rompe se le conoce como disbiosis. Existen diferentes factores que pueden causar un desequilibrio, entre ellos nutricionales, ambientales, químicos y hasta un mal proceso en la fabricación del aceite de pescado (Martínez-Porchas *et al.*, 2023).

El intestino cuenta con varias estrategias fisiológicas que ayudan a prevenir la población de patógenos, tales como la producción de moco con propiedades antibacterianas, rotación celular, actividad peristáltica, endocitosis en los enterocitos y producción de lisozima (Trushenski, 2015; Luan *et al.*, 2023). Los investigadores se mantienen en la búsqueda de pre- y probióticos que ayuden a reducir el uso de antibióticos, produciendo microorganismos que beneficien al microbiota intestinal mediante el ámbito nutricional (Zhou *et al.*, 2018) en las dietas adecuadas a la especie, ya que se conoce que en los peces

herbívoros que degradan celulosa las bacterias más predominantes son *Clostridium*, *Citrobacter* y *Leptotrichia*, mientras que para especies carnívoras se encuentra abundancia de *Cetobacterium* y *Halomonas* (Luan *et al.*, 2023).

Algunos prebióticos se encuentran conformados por ácidos grasos de cadena corta, oligosacáridos no digestibles e inulina como los presentes en cianobacterias y microalgas (Plaza *et al.*, 2019). En un estudio realizado por Plaza y colaboradores (2019), alimentaron una dieta con 3% de *Arthrospira platensis*, y encontraron que la microbiota se encontró compuesta por *Proteobacteria* (36,6%), *Fusobacteria* (32,9%) y *Actinobacteria* (37%). De acuerdo con Luan *et al.*, (2023), la alimentación con proteínas vegetales produce una reducción significativa de la diversidad de microbiota intestinal. En una investigación en la que se ofreció una dieta adicionada con el bagazo de yuca (*Manihot esculenta*) y el maíz molido, se registró un aumento de bacterias amilolíticas en la tilapia (Pedrotty *et al.*, 2015).

También se ha investigado el efecto de una dieta a base de lípidos sobre la microbiota intestinal, en donde se encontró que los ácidos grasos dietéticos pueden alterar la composición microbiana, al registrarse que *Pseudomonas* prevalecían más con una dieta de ácidos grasos saturados altos (Luan *et al.*, 2023). El hambre también puede influir en la microbiota intestinal de los peces, ya que se encontró que la *Proteobacteria* predomina más durante el ayuno y la *Firmicutes* durante la alimentación, lo que podría impactar significativamente en la microbiota de los peces (Luan *et al.*, 2023).

### **3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La creciente búsqueda de alimentos funcionales que incluyan los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento y desarrollo de los peces ha sido un desafío en los últimos años. Añadir ingredientes alternativos en pequeñas proporciones junto con la harina de pescado podría potencializar el uso de dietas para la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), que contribuyan a mejorar la asimilación de nutrientes y los parámetros de rendimiento. En el presente trabajo, se evaluó la eficiencia de utilización de los nutrientes en las dietas, la incorporación de nitrógeno y carbono en el tejido muscular, la actividad de tres enzimas como biomarcadores ante exposición a diesel y el papel de las comunidades bacterianas durante la alimentación con dichos ingredientes.

## 4. HIPÓTESIS

La inclusión de 3% y 6% de la biomasa microbiana (ProFloc™) o la cianobacteria (*Arthrospira platensis*) ayuda a mejorar los parámetros de rendimiento y la asimilación de carbono y nitrógeno en tejido muscular, además de conferir una protección hepática indicada por biomarcadores enzimáticos del hígado y conocer la biota microbiana del pez tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

## 5. OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de incluir una biomasa bacteriana comercial (ProFloc™) y cianobacteria (*Arthrospira platensis*, Agrovitae®) en dietas experimentales, sobre el crecimiento, asimilación de nutrientes y protección hepática, así como conocer la biota bacteriana en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

#### 5.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los parámetros de rendimiento de peces tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados con dietas formuladas con harina de pescado y suplementadas con cianobacteria y biomasa bacteriana al 3% y 6%.
2. Estimar la asimilación de nutrientes aportados por 3% y 6% de biomasa bacteriana dietaria y cianobacteria (*Arthrospira platensis*), en el músculo de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) por medio de mediciones de isótopos estables de carbono y nitrógeno.
3. Evaluar mediante los cambios isotópicos, los tiempos medios de residencia de nutrientes en tejido muscular y el papel relativo del crecimiento y la tasa metabólica en el cambio isotópico.

4. Evaluar el efecto de dietas experimentales con 3% y 6% de biomasa bacteriana o cianobacteria (*Arthrospira platensis*) y explorar el nivel de actividad de tres enzimas hepáticas por exposición a diésel en *Oreochromis niloticus*.
5. Evaluar el efecto de la inclusión de una biomasa bacteriana comercial y *Arthrospira platensis* sobre la diversidad del microbiota intestinal.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 LUGAR DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

Los tratamientos experimentales estuvieron conformados por dietas elaboradas a base de harina de pescado (Sardina premium<sup>®</sup>), obtenida de Costamar (Sonora, México), adicionadas con 0.3 y 6% *Arthrospira platensis*, (Agrovitae<sup>®</sup>, México) obtenida de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y con 0.3 y 6% de una harina de biomasa microbiana, ProFloc<sup>™</sup>, (Nutrinsic<sup>®</sup>, México; actualmente dicha harina pertenece a la compañía iCell con el nombre de HiTecPro).

Los estudios proximales de los ingredientes y las dietas se realizaron en el Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) y en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos de la Facultad de Agronomía (FA) de la U.A.N.L (Tabla 2). Las dietas experimentales se elaboraron en el departamento de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la UANL.

El bioensayo experimental y la evaluación de las enzimas de CE, GST y ALP se realizó en el Laboratorio de Producción Acuícola de la FMVZ de la UANL. El análisis de los isótopos estables se efectuó en la Universidad de California, Davis, en el departamento de Ciencias Vegetales en las instalaciones de Isotopos estables (SIF, por sus siglas en inglés). El análisis de metagenómica se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR, Campus La Paz, BCS).

### **6.2 ÁREA Y TIEMPO DE MUESTREO**

La manufactura de las dietas experimentales se llevó a cabo en el Programa de Maricultura de la FCB de la UANL, los días 06 de Julio y 28 de Julio de 2022. Posterior a esto, ya con dichas dietas elaboradas, se procedió a dar inicio al diseño experimental y bioensayo de alimentación, el cual tuvo lugar en el laboratorio de bioensayos de acuicultura de la FMVZ, iniciando el 27 de agosto y finalizando el 26 de septiembre de 2022.

### 6.3 DIETAS EXPERIMENTALES

Se formularon cinco dietas experimentales isonitrogenadas: 40.5% de proteína cruda e isoenergéticas: 4900 kcal/kg, con tres ingredientes principales: harina de pescado (Sardina premium<sup>®</sup>, 68% proteína), *A. platensis*, Agrovitae<sup>®</sup> (63% proteína) y biomasa microbiana, ProFloc<sup>™</sup> (68% Proteína). Los dos últimos ingredientes se agregaron a niveles aditivos al 3 y 6%, en relación con la proteína dietaria (Tabla 3). En la formulación se consideraron los requerimientos de nutrientes y energía publicados por el NRC (1993) y se utilizó el Software Nutrient Requirements of Fish and Shrimp (NRC, 2011).

La elaboración de los pellets se realizó en el departamento de Maricultura. Para cada dieta experimental, el procedimiento consistió en pesar los ingredientes mayores, seguido de los ingredientes presentes en menores proporciones utilizando una balanza (ScienTech<sup>®</sup>). Los ingredientes fueron incorporados en tazones de acero inoxidable de 4.7 L, posterior a esto se iban mezclando en una batidora clásica de pedestal de la marca KitchenAid<sup>®</sup>, (modelo K45SSWH, EUA) de 10 velocidades.

El primer mezclado tuvo una duración de 5 min a una velocidad de “3 rpm”, pasado los 5 min, se disminuyó la velocidad a “2 rpm” y se agregó lentamente el aceite de pescado hasta lograr una consistencia muy parecida a la panificación, enseguida, se administró agua a 85°C hasta 350 ml, finalmente el mezclado se dejó a una velocidad de “3 rpm” por 5 min. La dieta húmeda se pasó por un molino de carne (Torrey, M22RW) a una temperatura de 75°C, donde se obtenían los pellets con un diámetro de 1.6 mm.

Los pellets obtenidos del molino se pasaron a un horno de convección a 40-45°C durante 14 h, para posteriormente ser almacenadas para su uso posterior (García-Pérez *et al.*, 2018, 2020).

La composición proximal de los ingredientes y las dietas fue determinada mediante los siguientes métodos: Método NMX-Y-098-SCFI para humedad, descrito por la AOAC (2005), método Kjeldahl 960.52 para proteína (AOAC, 2016), método 920.39 para grasa (AOAC, 1990) utilizando un extractor tipo Soxhlet, método 942.05 para cenizas (AOAC,



1990), método 962.09 para fibra cruda (AOAC, 2000) y el extracto libre de nitrógeno (ELN).

**Tabla 2.** Análisis proximales de los ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas experimentales.

<b>Ingredientes</b>	<b>Harina de pescado (Alimentos Costamar®)</b>	<b><i>Arthrospira platensis</i> (Agrovitae®)</b>	<b>Biomasa microbiana (ProFloc™)</b>
Materia Seca (%)	92.11	92.27	74.64
Proteína (%/BS)	68.28	63.95	68.64
Lípidos (%)	8.15	1.05	10.26
Cenizas	15.64	9.19	21.30

**Tabla 3.** Formulación (g/1000 g de dieta) de cinco dietas experimentales para juveniles de tilapia del Nilo, utilizadas para evaluar parámetros de crecimiento, protección hepática y la asimilación de *Arthrospira platensis* (AP) y biomasa microbiana (BM) con respecto a la harina de pescado (H)

Dieta (g/kg)	Control	97H:3AP	94H:6AP	97H:3BM	94H:6BM
Harina de pescado, sardina <sup>a</sup>	615	605	580	600	590
Fécula de maíz <sup>b</sup>	286	267	281	250	258
Aceite de pescado <sup>c</sup>	95	105	100	110	100
<i>Arthrospira platensis</i> <sup>d</sup>	0	18	35	0	0
Biomasa microbiana (ProFloc <sup>TM</sup> ) <sup>e</sup>	0	0	0	16	28
Celulosa <sup>f</sup>	0	1	0	20	20
CMC <sup>g</sup>	10	10	10	10	10
Premezcla de vitaminas <sup>h</sup>	2	2	2	2	2
Premezcla de minerales <sup>h</sup>	2	2	2	2	2

<sup>a</sup>Alimentos Costamar (Sonora, México); Maizena<sup>®</sup>, <sup>b</sup>Unilever (Londres, Reino Unido); <sup>c</sup>Nutro<sup>TM</sup> (Madrid, España); <sup>d</sup>Agrovitae<sup>®</sup> UANL (Monterrey, N.L, México); <sup>e</sup>Nutrinsic Corporation (Glendale, CO, USA); <sup>f</sup>Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); <sup>g</sup>Carboximetilcelulosa, <sup>h</sup>Composición de la premezcla de vitaminas: retinol, 4,000 IU/g; tiamina, 24 g/kg; riboflavina, 16 g/kg; DL Ca pantotenato, 30 g/kg; piridoxina, 30 g/kg; cianocobalamina, 80 mg/kg; ascórbico ácido, 60 g/kg; menadione, 16 g/kg; colecalciferol, 3,200 IU/g; tocoferol, 60 g/kg; biotina, 400 mg/kg; niacina, 20 mg/kg; fólico ácido, 4 g/kg.<sup>d</sup> Composición de la premezcla de minerales: Co, 2 g/kg; Mn, 16 g/kg; Zn, 40 g/kg; Cu, 20 g/kg; Fe, 1 mg/kg; Se, 100 mg/kg; I, 2 g/kg.

## **6.4 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para llevar a cabo la medición de los parámetros zootécnicos, los peces se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: una oxigenación mayor a 6 mg/L con bombas sopladoras de aire (blower), temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , determinada a través un termómetro de mercurio, pH (8.4), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) de 20 ppm, amonio ( $\text{NH}_3^+$ ) de  $1.0 \pm 0.02$  mg/L, nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) de  $2 \pm 1$  mg/L. Los anteriores parámetros se midieron a través de tiras de pruebas de EasyStrips™ de la marca Tetra®, todo esto con la finalidad de mantener los rangos físico-químicos óptimos de la tilapia (*O. niloticus*).

Los cinco tratamientos (dietas experimentales) se evaluaron por cuadruplicado, considerando un diseño de bloques al azar, asignando cada una a 4 tanques de 120 L de capacidad, conteniendo 16 alevines de tilapia cada uno (20 tanques en total).

Durante el experimento, se realizaron biometrías a cada grupo experimental los días 0, 15 y 30 utilizando una balanza analítica, (marca A&D Company®, modelo: Fx-2000i), con la finalidad de ajustar la cantidad a asignar de alimento. Se registró el consumo diario (g/org), la mortalidad (%), restos de alimento (%) y observaciones de manera general durante todo el bioensayo.

Durante el bioensayo se tomaron muestras de los organismos en los días 0, 2, 4, 8, 16, 23 y 27. Se realizó la eutanasia de cada organismo mediante un shock hipotérmico, tal y como se encuentra regulado por la DGXI de la Comisión Europea (1995). Todo esto se llevó a cabo con la finalidad de obtener valores basales elementales e isotópicos, así como muestras del intestino.

Al término del bioensayo los animales se expusieron a diésel a bajas concentraciones durante 24 h, para luego extraer el hígado y medir los biomarcadores enzimáticos.

### **6.4.1 INSTALACIONES DEL BIOENSAYO**

El bioensayo se realizó en la FMVZ de la UANL ubicado en Hacienda del Canada, 66064, Cd. General Escobedo, N.L, México). La sala de bioensayo cuenta con 20 peceras de vidrio con una capacidad de 120 L, un sistema de aireación regulado por un blower,

conectado mediante tubos de distribución cada uno con válvulas y piedras difusoras y mangueras de plástico para mantener los niveles de oxígeno disuelto sobre 6 mg/L en cada acuario individual. El recambio de agua se realizó diariamente (15% del volumen total las primeras dos semanas y las otras dos semanas el 50%). Antes del ingreso a los acuarios dicha agua se dejaba en un tratamiento de 24 h con aireación para eliminar el exceso de cloro. Las peceras se encontraban compuestas por una área general y compartimientos laterales con piedras volcánicas, bio-glass (marca DYMAX<sup>®</sup>), bio-bolas (marca Biopro<sup>®</sup>) y termómetros de mercurio.

#### **6.4.2 ANIMALES EXPERIMENTALES**

Los alevines de tilapia del Nilo con un peso inicial de  $(0.8 \pm 0.01 \text{ g})$  fueron obtenidos de la unidad de producción acuícola “El paraíso del samoral”, Veracruz, México (La Antigua, Geo Villas del Puerto, 9177, Veracruz, Ver). Esta unidad de cría de peces está certificada como libre de enfermedades contagiosas. Los peces fueron transportados en bolsas de plásticos que contenían agua con saturación de oxígeno ( $> 4.5 \text{ ppm}$ ) hasta la sala de bioensayo de la (FMVZ) de la (UANL). El trayecto tuvo una duración de 15 h.

Una vez en la sala de bioensayo, se estableció un período de adaptación de tres días en un fotoperíodo de (12:12 h), alojados en acuarios de 39 cm de ancho x 124 cm de largo, con una capacidad de 120 L. Para conocer el rango de pesos iniciales de los peces se realizó una biometría inicial y con los datos de peso húmedo se verificaron mediante un histograma las clases de peso que irían por acuario. Mediante un ANOVA de un factor (SPSS<sup>®</sup>) se comprobó ausencia de diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los pesos de los alevines asignados a los estanques propios de cada réplica (bloques aleatorios).

Para establecer valores isotópicos basales en el músculo, durante el período de adaptación, los alevines recibieron un alimento comercial para el cual se habían estimado sus valores isotópicos previamente.

#### **6.4.3 PROTOCOLO DE ALIMENTACIÓN**

Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado, cada acuario replicado contenía 16 organismos. Todos los alevines de tilapia fueron alimentados tres veces al día (10:00 h,

14:00 h y 18:00 h) con la dieta asignada de las cinco dietas experimentales. Se asignó una tasa diaria de alimentación al 10% de la biomasa de alevines presentes en cada acuario. Después del segundo día experimental, la cantidad asignada para alimentación se ajustó de acuerdo con el consumo de alimento observado y los desperdicios de alimentos observados. En caso de que no hubiera restos del alimento del día anterior, se aumentaba el 5% de la cantidad asignada. En caso de existir restos observables, la cantidad asignada se disminuía en 3%.

## 6.5 PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS

Se registraron las biometrías de los peces a los 0, 15 y 30 días del experimento. Se estimó la biomasa de cada acuario como la suma de los pesos individuales de los alevines presentes en un acuario. Los parámetros zootécnicos se calcularon de acuerdo con las siguientes fórmulas (Castañeda Solís, 2013):

**Tabla 4.** Cálculos de los parámetros zootécnicos en animales de producción.

Parámetros zootécnicos	Fórmulas	Referencia
Ganancia de peso (GP) (g)	$GP: Pf - Pi$	University of Kentucky, 2023
Ganancia diaria media (g)	$(Pf - Pi) / \text{días alimentado}$	University of Kentucky, 2023)
Tasa de crecimiento (TC%)	$(\text{peso final} - \text{peso inicial} / \text{peso inicial}) * 100$	Quintino-Rivera, 2022
Tasa de crecimiento específico (TCE) (%/día)	$100 * \ln(\text{peso final} / \text{peso inicial}) / \text{días}$	Ali et al., 2016; Xia et al., 2021
Factor de conversión alimenticia (FCA)	$\text{Alimento consumido (g)} / \text{biomasa ganada (g)}$	Ali et al., 2016
Sobrevivencia (S %)	$(Nf / Ni) * 100$	Quintino-Rivera, 2022

## 6.6 ANÁLISIS ISOTÓPICO

Con el fin de determinar la influencia nutricional e isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) de los ingredientes experimentales sobre el tejido muscular de los peces, durante el bioensayo se muestreó un pez de manera aleatoria por cada unidad experimental replicada los días 0,2,4,8,16,23 y el día 30 se muestreó por duplicado cada pecera, antes de su primera alimentación. Para realizar el muestreo, los peces se eutanasiaron por hipotermia de acuerdo con lo aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la FMVZ (número de folio: 36/2022) y se almacenaron en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Al finalizar el bioensayo (día 30), se obtuvo el músculo lateral de las tilapias. Las muestras de músculo fueron deshidratadas a una temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  durante 24h en una estufa de aire forzado Thermo Scientific™. Los peces obtenidos del día dos tuvieron una deshidratación de pez completo por 48h a la misma temperatura, con el fin de evitar la pérdida de muestra, debido a la baja disponibilidad de tejido muscular.

Posteriormente, las muestras secas se molieron manualmente en un mortero de porcelana hasta lograr obtener un polvo fino, el cual fue almacenado en tubos Eppendorf. Una muestra de  $1\text{ mg} \pm 0.1$  de cada individuo muestreado fue pesada en una balanza analítica (ORION, HR 200, A&D®) y después incorporada en microcontenedores de estaño (D1008, Elemental Microanalysis Ltd, UK), donde se organizó e identificó cada muestra en placas tipo ELISA de 96 pozos para su posterior envío a análisis isotópico para carbono y nitrógeno en el Stable Isotope Facility (SIF) del Departamento de Ciencias Botánicas, de la Universidad de California, (Davis, CA, USA.).

Los perfiles elementales e isotópicos de las muestras fueron determinados mediante un analizador elemental (PDZ Europa ANCA-GSL) acoplado a un espectrómetro de masas de flujo continuo para isótopos estables (IRMS) PDZ Europa 20-20 (Sercon Ltd., Cheshire, Reino Unido) (Universidad de California Davis, 2020). Dichos valores isotópicos se expresan en notación delta ( $\delta$ ), definida como unidades (partes por mil, ‰) de desviaciones a partir de valores isotópicos del nitrógeno y carbono establecidos por los materiales estándar de referencia (nitrógeno atmosférico) y para carbono Viena Pee Dee Belemnite (VPDB) (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009; Castañeda Solís, 2013; García-

Pérez *et al.*, 2018). Chérel *et al.* (2005) emplean el término “factor de discriminación” para describir los cambios en los valores isotópicos entre un organismo consumidor (cuerpo entero o tejido específico) y su dieta, después de haber alcanzado el equilibrio isotópico ( $\Delta^{15}\text{N}$  o  $\Delta^{13}\text{C}$ ).

### **6.6.1 ESTIMACIÓN DE LAS CONTRIBUCIONES NUTRICIONALES AL CRECIMIENTO**

Las proporciones de carbono y nitrógeno dietario contribuidas por los ingredientes al crecimiento de la tilapia (*O. niloticus*), fueron estimadas a partir de los valores isotópicos analizados en cada uno de los ingredientes experimentales y en muestras de tejido muscular obtenidas en el día final del experimento. Los valores isotópicos se integraron mediante un modelo de mezclado isotópico para dos fuentes nutricionales y un isótopo (Phillips y Gregg, 2001).

El modelo descrito en previas investigaciones (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009; Castañeda-Solís, 2013; Barreto-Curiel *et al.*, 2018; Alvarado-Ibarra, 2019) considera las diferencias isotópicas entre las fuentes dietarias (harina de pescado, *Arthrospira platensis* y la biomasa microbiana) y el consumidor (en el presente estudio, a partir del músculo de la tilapia del Nilo), así como el tamaño muestral y la variabilidad isotópica.

Los valores de control isotópico positivo y negativo utilizados para corregir los factores de discriminación ( $\Delta^{13}\text{C}$  y  $\Delta^{15}\text{N}$ ) en el modelo de mezclado isotópico, se tomaron de las diferencias isotópicas entre las tilapias y la *Arthrospira platensis* en un estudio previo (Narváez-Velázquez, no publicado), mientras que, para la biomasa microbiana, se usó como factor de discriminación un promedio bibliográfico (3.4 ‰, Post, 2002).

En el cálculo completo se considera que los modelos de mezclado funcionan bajo las siguientes cuatro premisas:

- 1) Que los ingredientes tengan valores isotópicos contrastantes
- 2) Que los valores isotópicos del consumidor cambien a través del tiempo como resultado de los cambios de dieta (Fry, 2006)
- 3) Que el organismo consumidor alcance un equilibrio isotópico con su dieta

4) Que los contenidos elementales (C y N) de los ingredientes sean conocidos.

#### **6.6.2 TASA DE RECAMBIO DE NUTRIENTES Y TIEMPO MEDIO RESIDENCIAL ELEMENTAL EN EL TEJIDO**

Los valores isotópicos de nitrógeno y carbono obtenidos de los análisis fueron incorporados en el modelo exponencial de Hesslein et al. (1993) (Ecuación 1), la cual ayuda a conocer a quien se le debió la diferencia, si a la tasa de recambio metabólico o al crecimiento durante el cambio isotópico observado en la tilapia del Nilo.

$$C_{muestra} = C_n + (C_0 - C_n)e^{-(k + m)t}$$

#### **Donde:**

$C_{muestra}$  es el valor isotópico  $\delta^{13}C$  y  $\delta^{15}N$  obtenido del tejido muscular de la tilapia al tiempo ( $t$ ).

$C_n$  es el valor isotópico alcanzado cuando las tilapias se encuentran en equilibrio con una nueva dieta

$C_0$  es el valor isotópico de carbono y nitrógeno en el tejido en equilibrio con la dieta inicial.

Los parámetros  $k$  y  $m$  representan el crecimiento y la tasa de renovación del tejido metabólico

La “ $k$ ” se calculó con la siguiente (Ecuación 2):

$$k = \ln (W_f/W_0)/t$$

#### **Donde:**

$W_f$  es el peso final

$W_0$  es el peso inicial obtenido de la biometría durante el bioensayo

$t$  representa los días (tiempo)

El parámetro “ $m$ ” se derivó de la ecuación 1, y debido a que es desconocido, se calculó usando regresión no lineal iterativa para encontrar el mejor ajuste.

Los valores calculados previamente ( $k$  y  $m$ ), se incorporaron en una ecuación que permite obtener una estimación del período de tiempo necesario para que la mitad del nitrógeno o



carbono en el músculo alcance el equilibrio isotópico (que sea reemplazado) después de que los vertebrados consumen una nueva dieta (tiempo medio de residencia,  $t_{50}$ ) (MacAvoy *et al.*, 2005; Ecuación 3):

$$t_{50} = \ln(2) / (m + k)$$

## **6.7 BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS**

### **6.7.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Al finalizar el bioensayo y el período de alimentación, se seleccionaron de manera aleatoria 10 peces de cada dieta experimental de manera aleatoria y fueron expuestos a diésel (D<sub>2</sub>) variante 305-82, el cual fue comprado en una gasolinera de PEMEX® en Monterrey, Nuevo León, México.

El Diesel se administró mediante inyección intraperitoneal disolviéndolo en 0.5 ml en aceite comestible puro de soya (Nutrioli®) adquirido en una empresa local de Monterrey, México, a una dosis de 20 µl/kg (D+DC, D+3AP, D+6AP, D+3BM, D+6BM). Para propósitos comparativos, 10 peces de cada dieta experimental se inyectaron con 0.5 ml con aceite vegetal sin diésel (O+DC, O+3AP, O+6AP, O+3BM, O+6BM), durante un período de 24 h, de acuerdo con lo reportado por Cruz-Valdez (2005) y González *et al.* (2015).

Al finalizar el desafío, los peces fueron sacrificados por hipotermia de acuerdo con lo establecido por Organización Mundial de la Salud Animal (WOAH) por sus siglas en inglés y en AVMA (Guidelines for the euthanasia of animals, 2020). De cada pez se obtuvieron muestras de hígado y se almacenaron en un ultracongelador a -80°C, para posteriormente evaluar la actividad enzimática carboxilesterasa (CE), Glutathion S-transferasa (GST) y Fosfatasa Alcalina (ALP). El protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética y Bienestar Animal de la FMVZ (número de folio: 36/2022).

### **6.7.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS**

El estudio de los biomarcadores enzimáticos se realizó en el Laboratorio de Producción Acuícola de la FMVZ de la UANL. Se obtuvieron extractos enzimáticos de cada muestra de hígado de tilapia del Nilo para lo cual se homogenizaron en un mortero durante 4 minutos con agua destilada con una proporción 1:10 (peso de la muestra: agua destilada, m/v), posteriormente los homogeneizados fueron centrifugados a 2000 g (Heathrow Scientific®) durante 15 minutos a una temperatura controlada (10°C). Se obtuvieron los sobrenadantes y se prepararon alícuotas en microtubos y se almacenaron en ultracongelación a -80°C hasta la evaluación de la CE, ALP y GST.

### **6.7.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CE, ALP Y GST**

Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como proteína de calibración estándar. La actividad de GST se midió mediante un método adaptado a microplacas de acuerdo con Wilce y Parker (1994). En cada pozo se agregaron 190 µL de una mezcla de sustrato conteniendo L-glutation (200 mM) y 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB; 100 mM) en buffer salino Dulbecco's (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl y 8,9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, pH, 7.2). Finalmente se agregaron 10 µL de extracto enzimático para iniciar la reacción. Se realizaron lecturas de absorbancia inmediatamente a 340 nm cada dos minutos durante un período de 10 min en un lector de microplacas EPOCH™ (BioTek). La actividad de GST se expresó en µmol min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, utilizando un coeficiente de extinción molar de 5.3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para CDNB.

La actividad de CE, se determinó de acuerdo al procedimiento de Ellman *et al.* (1961), modificado por Huang *et al.*, (1997). En cada pozo, se agregaron 200 µL de buffer tris-HCl (50 mM), 10 µL de extracto enzimático y 100 µL de 4-nitrofenil acetato (2mM) como sustrato para iniciar la reacción. Se realizaron lecturas de absorbancia a 405 nm cada 2 min durante 10 min. La actividad de CE se expresó en µmol min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, utilizando un coeficiente de extinción molar de 18.5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

La actividad de ALP se determinó utilizando como sustrato 4-nitrofenil-fosfato. La reacción se realizó utilizando 200 µL de buffer de dietanolamina (1.0 M) con 50 mM

MgCl<sub>2</sub> (pH 9.8). Posteriormente se añadieron 10 µL de extracto enzimático. Para la evaluación de la cinética enzimática se midió la degradación del sustrato mediante 405 nm cada 2 min por un período de 10 min. La actividad de ALP se expresó en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ , utilizando un coeficiente de extinción molar de  $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los procedimientos se basaron en investigaciones previas (González *et al.*, 2015; García-Pérez *et al.*, 2020; García-Ponce, 2020; Rincón-González, 2022).

#### **6.7.4 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA**

El contenido proteico de los extractos enzimáticos, se determinó mediante el método de Bradford (1976), adaptado para su uso en microplacas y los resultados se expresaron en miligramos de proteínas por mililitro ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

Se realizó una calibración con una curva estándar de 0.05 a 0.5 mg de albumina de suero bovino BSA (A-2153, Sigma) por mL de agua destilada, en triplicado. Para ello en cada pozo se administraron 10 µL de muestra y cada tratamiento se realizó por triplicado. Posterior a esto, se leía cada dos minutos una lectura, realizando un total de seis lecturas de espectrofotométrica donde se leyeron las placas a 620 nm en un lector de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, US).

### **6.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE LA TILAPIA**

#### **6.8.1 EXTRACCIÓN CUANTIFICACIÓN DEL ADN**

Para conocer la microbiota intestinal de las tilapias mantenidas bajo los diferentes tratamientos nutricionales, se muestrearon organismos de manera aleatoria de cada tratamiento al final del bioensayo (día 30). Las muestras se mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; posteriormente se diseccionaron y se extrajo el intestino, que fue almacenado en tubos eppendorf 1.5 mL (SSIbio®) con etanol al 90% antes de la extracción de ADN. Cada tratamiento fue analizado por triplicado, obteniendo una porción de intestino por tratamiento.

Para la extracción del ADN bacteriano de intestino de tilapia se utilizó el Kit DNeasy® UltraClean® Microbial de QIAGEN y se siguió la guía proporcionada por el fabricante. El ADN resultante de las muestras fue analizado en un espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific™) para observar la pureza y posteriormente en un gel de agarosa la integridad.

### **6.8.2 PREPARACIÓN DE LIBRERÍA Y SECUENCIACIÓN**

Se realizó la amplificación de PCR de la región V3 del ARNr 16S utilizando el primer 515F (5'-GTG CCAGCMGCC GCG GTAA-3'). Los amplicones fueron secuenciados usando el kit de ciclo Illumina MiSeq 500 con el sistema de secuenciación Illumina Miseq.

### **6.8.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

Las lecturas resultantes FASTQ de la secuenciación fueron limpiadas con el programa FastQC y posteriormente alineadas utilizando la base de datos bacteriana SILVA en el software MOTHUR v1.48.0 (Schloss *et al.*, 2009). Para el estadístico se utilizó el paquete de R (software) DESeq2 (Love, Huber y Anders, 2014) para determinar diferencias significativas entre las abundancias relativas de los diferentes taxones entre los tratamientos.

## **6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los datos se analizaron para evaluar la suposición de distribución normal y la homogeneidad de la varianza. Para determinar diferencias significativas entre los diferentes parámetros zootécnicos se realizó un ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de comparación múltiples de medias de Tukey para determinar diferencias entre pares de tratamientos. Para la comparación de las actividades enzimáticas se utilizó la prueba de Tukey para los datos normales. Las proporciones de carbono y nitrógeno dietario establecidas durante la formulación de las dietas experimentales (proporciones esperadas), fueron comparadas con las proporciones de C y N realmente asimiladas en el tejido muscular (proporciones observadas). La comparación estadística se realizó por

medio de una prueba de bondad de ajuste Chi-cuadrada ( $X^2$ ) a un nivel de significancia del 0.05.

Todas las pruebas se realizaron utilizando el software SPSS 17.0 (SPSS Inc.) con un nivel de significación de  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 ANÁLISIS DE DIETAS

#### 7.1.1 COMPOSICIÓN DE LOS INGREDIENTES EXPERIMENTALES

En la tabla 5, se muestran los resultados obtenidos de los análisis proximales de las cinco dietas elaboradas, siguiendo los estándares establecidos por la AOAC (1995). Donde las dietas resultaron ser isonitrogenadas (40.5% proteína cruda) e isoenergéticas (5.12 kcal/g). En cuanto a los lípidos se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), ya que las dietas 97H:3AP y 97H:6AP tuvieron contenidos de lípidos mayores a los del resto de las dietas. Por otro lado, para el extracto libre de nitrógeno (ELN), la dieta control (H) fue significativamente diferente a los valores de las demás dietas.

**Tabla 5.** Análisis proximal (%; g/1000 g; Kcal/g) de las cinco dietas experimentales formuladas para estimar la contribución de nitrógeno dietario a partir de harina de pescado (H), *Arthrospira platensis* (AP) y biomasa microbiana (BM).

Valores proximales	100 H	97H:3AP	94H:6AP	97H:3BM	94H:6BM
Proteína cruda (%)	39.0 ± 0.01	41.2 ± 0.16	42.1 ± 1.41	38.0 ± 2.19	42.9 ± 0.80
Lípidos (%)	14.9 <sup>b</sup> ± 0.31	16.2 <sup>a</sup> ± 0.23	15.4 <sup>b</sup> ± 0.03	16.1 <sup>a</sup> ± 0.16	15.3 <sup>b</sup> ± 0.03
Fibra cruda (%)	6.6 ± 0.89	8.3 ± 1.56	7.2 ± 0.26	7.3 ± 0.13	6.9 ± 0.04
Cenizas (%)	9.0 ± 0.14	10.2 ± 0.91	10.7 ± 0.23	11.2 ± 1.83	9.2 ± 0.34
ELN (%)	30.26 <sup>a</sup>	24.01 <sup>ab</sup>	24.39 <sup>ab</sup>	27.22 <sup>ab</sup>	25.54 <sup>ab</sup>
Energía bruta (Kcal/g)	5.120	5.561	5.057	4.954	4.934

## 7.2 RENDIMIENTO PRODUCTIVO DE LA TILAPIA

Los resultados de crecimiento obtenidos a partir del presente estudio, analizados mediante ANOVA, indican que no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los parámetros de crecimiento (peso final, GP, tasa de crecimiento específico (TCE), factor de conversión alimenticia (FCA), tasa de crecimiento (TC), ganancia diaria media (GDM) y sobrevivencia por efecto de los cinco tratamientos evaluados (Tabla 6).

**Tabla 6.** Parámetros zootécnicos de la tilapia del Nilo, después de los 30 días de bioensayo.

	Control	97H:3AP	94H:6AP	97H:3BM	94H:6BM
Peso inicial (g)	$0.8 \pm 0.01$	$0.8 \pm 0.02$	$0.8 \pm 0.009$	$0.8 \pm 0.004$	$0.8 \pm 0.004$
Peso final (g)	$17.77 \pm 1.56$	$18.28 \pm 0.86$	$17.55 \pm 3.82$	$18.1 \pm 0.76$	$17.51 \pm 0.83$
GP (g)	$16.96 \pm 1.55$	$17.46 \pm 0.86$	$16.74 \pm 3.83$	$17.32 \pm 0.76$	$16.71 \pm 0.82$
GDM (g)	$0.56 \pm 0.05$	$0.58 \pm 0.02$	$0.55 \pm 0.12$	$0.57 \pm 0.02$	$0.55 \pm 0.02$
TC (%)	$2085.98 \pm 148.4$	$2151.4 \pm 121.63$	$2077 \pm 490.33$	$2165 \pm 87.67$	$2084.46 \pm 97.98$
FCA	$1.06 \pm 0.12$	$1.13 \pm 0.20$	$1.27 \pm 0.19$	$1.03 \pm 0.12$	$1.21 \pm 0.14$
TCE (%/día)	$10.27 \pm 0.22$	$10.37 \pm 0.17$	$10.21 \pm 0.77$	$10.40 \pm 0.13$	$10.27 \pm 0.14$
Sobrevivencia (%)	100	100	100	100	96

En cuanto a la tasa de crecimiento, al final del ensayo, las dietas lograron proporcionar alrededor del 2000% de ganancia de peso respecto al peso inicial, donde el tratamiento con 3% de biomasa microbiana (97H:3BM) promovió la mayor TC y TCE, sin embargo, las diferencias entre tratamientos fueron no significativas ( $P > 0.05$ ).

El FCA indica que las dietas experimentales se encontraron muy cerca de 1:1, sin embargo, el tratamiento con una incorporación de 3% de BM fue la que mejor desempeño

obtuvo, sin que las diferencias entre tratamientos fueran significativas ( $P > 0.05$ ). El tratamiento control se mantuvo con valores medios entre ambos ingredientes experimentales (biomasa bacteriana y Spirulina). El porcentaje de sobrevivencia fue del 100% excepto con una incorporación de 6% de BM.

### 7.3 CAMBIOS ISOTÓPICOS Y FACTORES DE DISCRIMINACIÓN

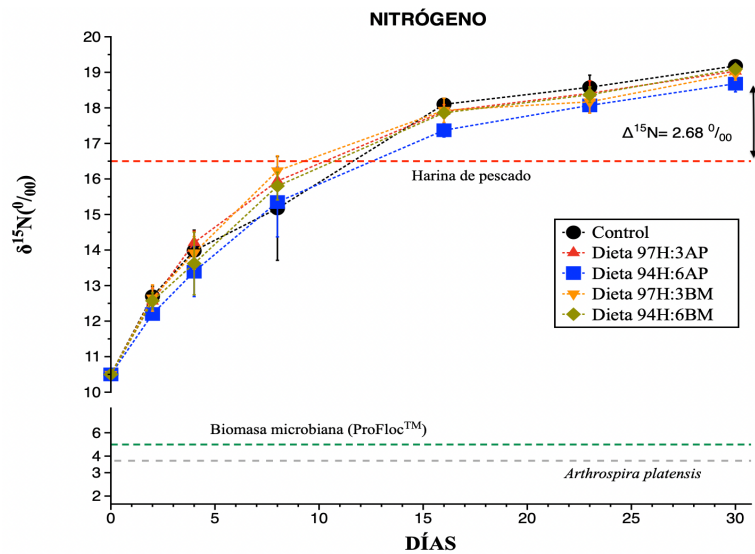
Antes del inicio del bioensayo, la dieta de acondicionamiento causó valores isotópicos basales  $\delta^{13}\text{C} = -22.0 \text{ ‰}$  y  $\delta^{15}\text{N} = 10.4 \text{ ‰}$  en el músculo de las tilapias. Posteriormente, durante el bioensayo y una vez diversificados los tratamientos, se observó en el tejido muscular que los valores isotópicos de ambos elementos tuvieron un cambio exponencial (Fig. 3 y 4). Los valores de BM y AP fueron significativamente diferentes para  $\delta^{15}\text{N}$  ( $4.89 \pm 0.05$  y  $3.69 \pm 0.04 \text{ ‰}$ ) y también para  $\delta^{13}\text{C}$  ( $-20.97 \pm 0.02$  y  $-27.67 \pm 0.07 \text{ ‰}$ ). Mientras que para el tratamiento control con harina de pescado se encontró en  $\delta^{15}\text{N} = -16.50 \pm 0.20 \text{ ‰}$  y para  $\delta^{13}\text{C} = -19.5 \pm 0.4 \text{ ‰}$ . Estas diferencias registradas en las dietas experimentales con ingredientes con valores isotópicos diferentes facilitaron la estimación de las contribuciones nutricionales de los dos ingredientes principales, por medio de un modelo de mezclado isotópico (Tabla 7). Todas las dietas experimentales promovieron una rápida influencia en los valores isotópicos del tejido muscular de la tilapia desde el día 03 para  $\delta^{15}\text{N}$  y desde el día 02 para  $\delta^{13}\text{C}$ . Las dietas experimentales causaron un equilibrio isotópico tanto para  $\delta^{15}\text{N}$  como para  $\delta^{13}\text{C}$ .

Los valores de  $\Delta^{15}\text{N}$  entre la tilapia y los ingredientes fueron semejantes, a excepción de la dieta con 6BM donde fue diferente y asimismo existió poca asimilación de nitrógeno a partir de la BM (Tabla 7). Se observó también que los tratamientos 3AP, 3BM y 6BM mostraron similitud con la firma isotópica del tratamiento control hasta el día 30, mientras que el tratamiento 6AP obtuvo una menor discriminación isotópica (Fig. 3).

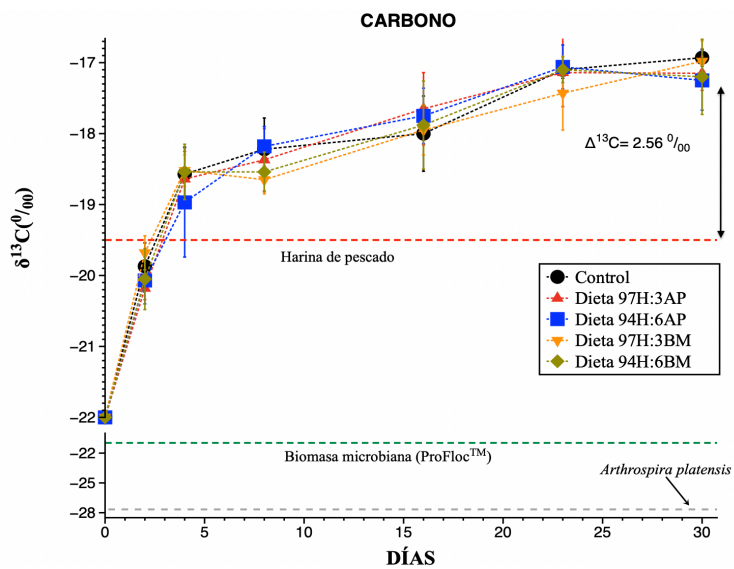
Al final del estudio, los valores isotópicos de nitrógeno en los tratamientos experimentales sobrepasaron el valor isotópico del tratamiento control alcanzando un valor de  $19.09 \text{ ‰}$  (Fig. 3). Para los valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  se observó que los tratamientos con 6% de ingredientes



aditivos presentaron menor discriminación isotópica con respecto a los demás tratamientos (Fig. 4).



**Figura 3.** Valores de isótopos estables de nitrógeno (‰) en el tejido muscular de las tilapias alimentadas con dietas experimentales formuladas con harina de pescado (H) y adicionadas con *Arthrospira platensis* (AP) y biomasa microbiana (BM). Las líneas de tendencia exponencial representan el promedio de los resultados obtenidos al realizar el análisis de isótopos estables en músculo en los diferentes días de muestreo y las líneas punteadas horizontales representan los valores isotópicos de los ingredientes.



**Figura 4.** Valores de isótopos estables de carbono (‰) en el tejido muscular de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas con dietas experimentales formuladas con harina de pescado (H) y adicionadas con *Arthrospira platensis* (AP) y biomasa microbiana (BM).

## 7.4 NITRÓGENO Y CARBONO TIEMPOS MEDIOS DE RESIDENCIA

Los cambios isotópicos de nitrógeno y carbono en el tejido muscular tuvieron una tendencia exponencial causada por los valores isotópicos de las dietas experimentales. Se estimó que el recambio metabólico (m) de nitrógeno en músculo mostró alta variabilidad para nitrógeno ( $0.017 - 0.037 \text{ d}^{-1}$ ) y para carbono ( $0.001 - 0.013 \text{ d}^{-1}$ ). Asimismo, los tratamientos adicionados con 3% de AP y BM (97H:3AP y 97H:3BM) tuvieron valores semejantes en la tasa de crecimiento.

**Tabla 7.** Tasas de crecimiento (k), tasas estimadas de recambio metabólico (m) y tiempo medio de residencia ( $t_{50}$ ) del nitrógeno y carbono en tejido muscular de tilapia (*Oreochromis niloticus*) alimentadas con diferentes dietas formuladas con harina de pescado (H), *Arthospira platensis* (AP) y biomasa microbiana, ProFloc™ (BM).

Tratamiento	k ( $\text{d}^{-1}$ )	m ( $\text{d}^{-1}$ )*		k vs m (%)		t <sub>50</sub> (d)		r <sup>2</sup>	
		$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$
Control	0.1029± 0.006	0.017	0.011	86-14	90-10	5.7	6.0	95	87
97H:3AP	0.1038± 0.003	0.037	0.013	74-26	89-11	4.9	5.9	98	87
94H:6AP	0.1029± 0.008	0.019	0.001	84-16	99-1	5.6	6.6	97	85
97H:3BM	0.1039± 0.003	0.023	0.013	82-18	89-11	5.4	5.9	98	85
94H:6BM	0.1028± 0.006	0.021	0.009	83-17	92-8	5.5	6.1	98	81

\*El valor m fue estimado por regresión iterativa no lineal mediante la ecuación de Hesslein y a a partir de los valores isotópicos observados en el tiempo. Dentro de cada división se indica el valor “r” correspondiente al ajuste de los valores observados con aquellos predichos por el modelo.

En la Tabla 7 se puede observar que, con respecto al 100% del cambio isotópico para el nitrógeno, este cambio isotópico en el tratamiento control (H) fue mayormente (86%) causado por el crecimiento, mientras que solamente 15% del cambio isotópico fue causado por la tasa de recambio metabólica. En contraste, con la dieta adicionada con 3AP, k muestra un valor de 74% y m un valor de 26%. El tiempo medio de residencia  $t_{50}$  de nitrógeno de las tilapias fue mayor para los peces que recibieron la dieta 100 H y menor para 3AP (97H:3AP). Para carbono el ( $t_{50}$ ) en tejido muscular fue mayor para 6AP (94H:6AP) comparado con 3AP (97H:3AP) y 3BM (97H:3BM).

## 7.5 CONTRIBUCIONES DE CARBONO Y NITRÓGENO PROVENIENTES DE LOS TRES INGREDIENTES EXPERIMENTALES

Los resultados mostrados en la Tabla 8 indican que existe una mejor asimilación de nitrógeno de la biomasa microbiana, ProFloc™ (BM) al implementar una inclusión al 3% comparado con el 6%, mientras que para carbono las contribuciones fueron mayores a las proporciones establecidas en dichas dietas. Por otro lado, las contribuciones de nitrógeno por *Arthrospira platensis* (AP) muestran una asimilación inferior a las establecidas en la formulación de las dietas.

**Tabla 8.** Proporciones relativas de nitrógeno y carbono dietético asimilado en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) sometida a diferentes tratamientos. Las proporciones de C y N en las dietas se consideran como proporciones esperadas y las obtenidas en tejido muscular se consideran las proporciones observadas.

	Composición de la dieta	Nitrógeno en la dieta (%)	Nitrógeno asimilado en músculo (%)	Carbono en la dieta (%)	Carbono asimilado en músculo (%)
97HP:3AP	Control	97	98.75 ± 0.46	97.2	96.75 ± 1.14
	AP	3	1.24 ± 0.46	2.8	3.24 ± 1.14
94HP:6AP	Control	94	95.86 ± 0.46	94.4	95.32 ± 1.95
	AP	6	4.14 ± 0.46	5.6	4.67 ± 1.95
97HP:3BM	Control	97	98.14 ± 0.47	97.5	96 ± 5.27
	BM	3	1.85 ± 0.47	2.5	4.0 ± 5.27
94HP:6BM	Control	94 <sup>a</sup>	99.15 ± 0.47 <sup>b</sup>	95.7 <sup>a</sup>	85 ± 9.4 <sup>b</sup>
	BM	6	0.85 ± 0.47	4.3	15 ± 9.4

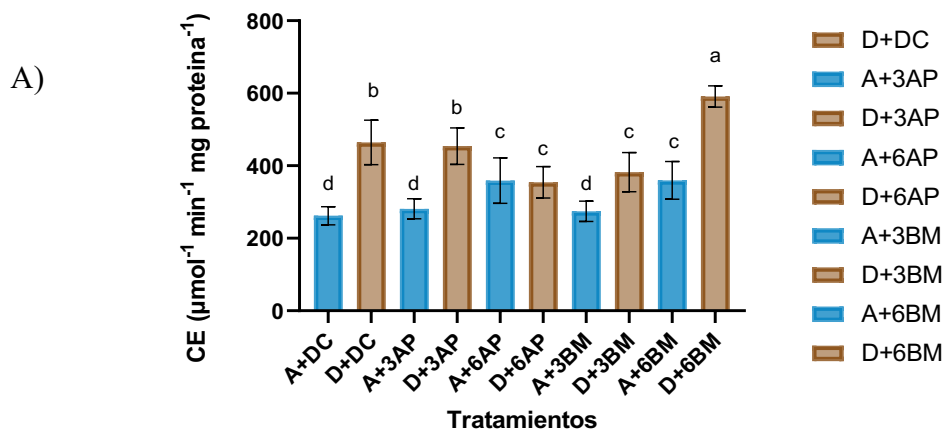
\*Los superíndices indican diferencias significativas (pruebas de Chi-cuadrada) entre las contribuciones esperadas (dieta) y observadas (tejido) de nitrógeno dietético a partir de biomasa microbiana.

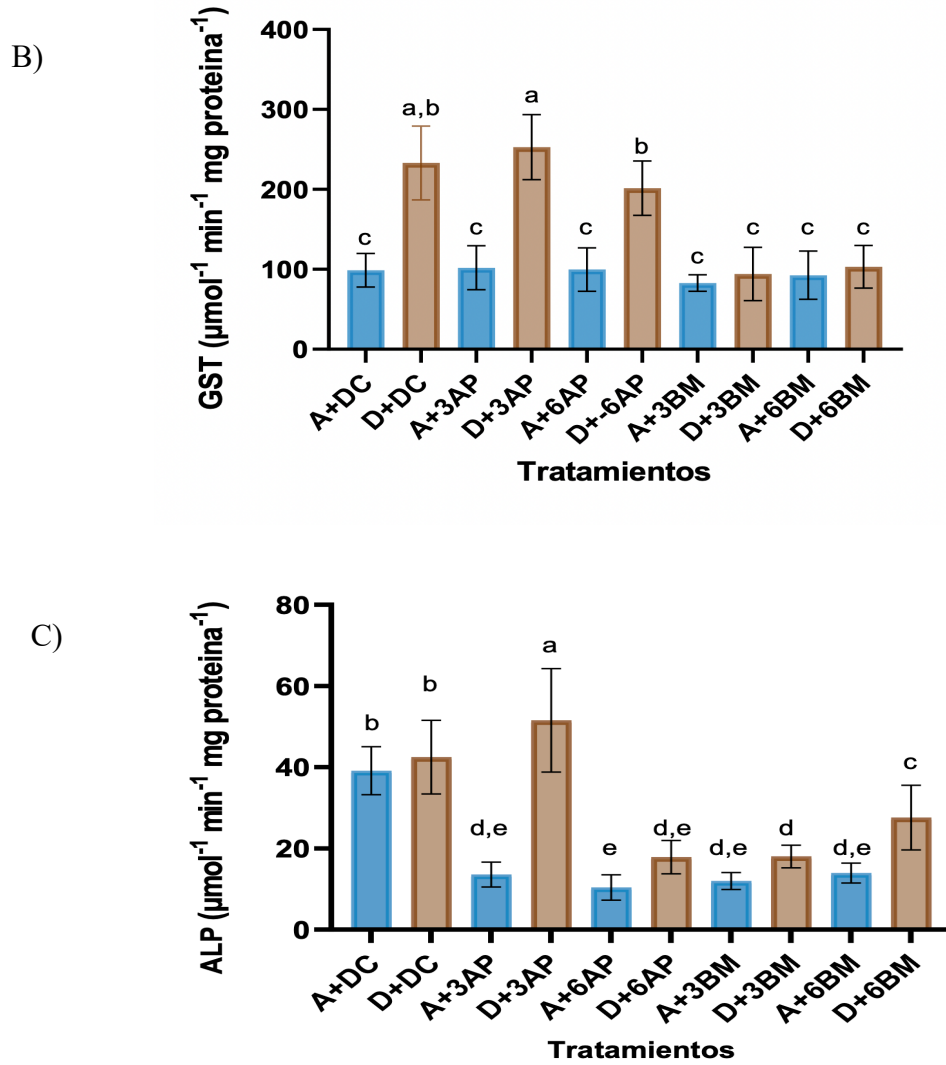
## 7.6 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA HEPÁTICA

El diésel administrado por vía parenteral, como desafío que simulaba contaminación por hidrocarburos provocó un incremento de la actividad enzimática de la CE en los tratamientos experimentales, excepto en el tratamiento con 6 Ap ( $p=1.00$ ) (Fig. 5A).

El diésel no provocó actividad enzimática de la GST en presencia del tratamiento experimental con biomasa microbiana (SCP). Sin embargo, en los tratamientos con *Arthrospira platensis* (3AP y 6AP), el diésel provocó un incremento significativo de la actividad enzimática similar a la registrada para el tratamiento control (Fig. 5B).

Por otro lado, la ALP no mostró diferencias ( $p= 0.937$ ) al aplicar diésel (D+DC) con respecto al tratamiento control (A+DC) (Fig. 5C). Sin embargo, el diésel provocó actividad enzimática significativa en el tratamiento experimental 3 AP ( $p= 0.001$ ), mientras que, con el tratamiento experimental con 6 AP, no provocó actividad enzimática significativa en presencia de diésel. En el tratamiento con biomasa microbiana (SCP) el diésel provocó actividad enzimática significativa con 6 SCP ( $p= 0.001$ ), mientras que con 3 SCP no provocó una respuesta significativa.



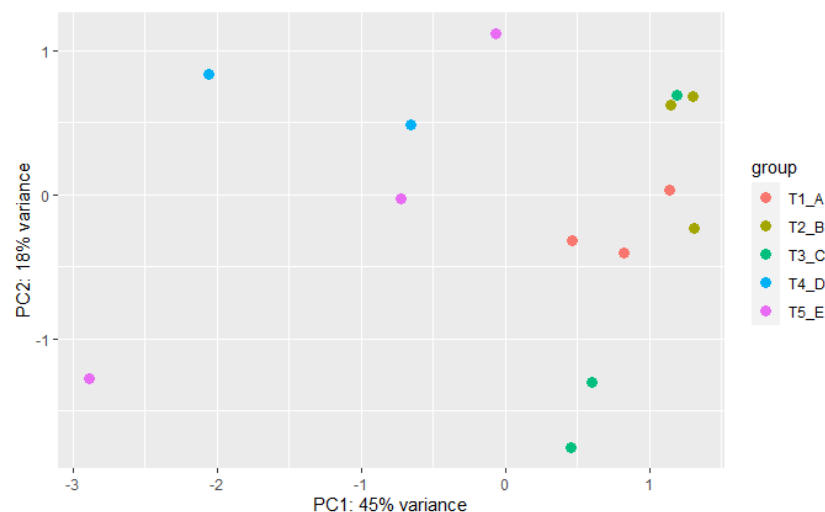


**Figura 5.** Actividad enzimática de CE 5(A), GST 5(B) y ALP 5(C) en las cinco dietas experimentales, con exposición al diésel (D) y con aceite de pescado (A) en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

## 7.7 CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LA TILAPIA

### 7.7.1 EFECTOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA

Los cambios en la composición de la comunidad bacteriana del intestino de la tilapia a los 30 días del bioensayo después de ser alimentados con BM y AP se muestran en la Figura 6. La diferencia entre las muestras se explica por el primer componente principal (PCA). Para obtener información sobre la riqueza de especies, se utilizó el número de Unidades taxonómicas operativas OTU's. El PCA considera que las comunidades microbianas de peces en el tratamiento 3AP (T1\_A) tuvieron diversidad microbiana parecida a la de los demás tratamientos. De igual forma, se observa que el 6AP (T2\_B) se agruparon de manera similar, excepto una muestra de peces que se alimentó con T2\_B, asimismo una muestra de 3BM (T3\_C) se encontró dentro de la diversidad de T2\_B; resultando más dispersos los tratamientos T4\_D y T5\_5.



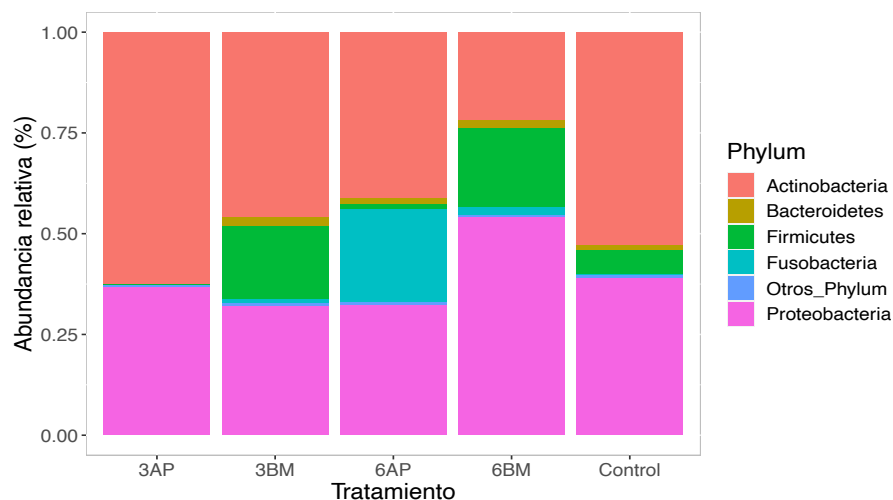
**Figura 6.** Los grupos de diversidad a nivel de OTU, se representa en gráfico de componentes principales (PCA) mostrando el grupo de tratamientos a nivel familia a los 30 días del bioensayo experimental.

### 7.7.2 CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE PHYLUM, CLASE Y FAMILIA

La abundancia relativa a nivel phylum de las muestras obtenidas el día 30 del bioensayo de manera aleatoria del tejido intestinal de las tilapias por cada unidad experimental replicada, se muestra en la Figura 7.

*Actinobacteria* (52.87%) y *Proteobacteria* (39.01%) fueron los filos predominantes en el tratamiento control, y en los tratamientos que contenían una inclusión del 3%. El tratamiento 6AP se encontró conformada por *Actinobacteria* (41.26%), *Proteobacteria* (32.15%) y *Fusobacteria* (23.02%). Los tratamientos con BM mostraron filos más abundantes con *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes*.

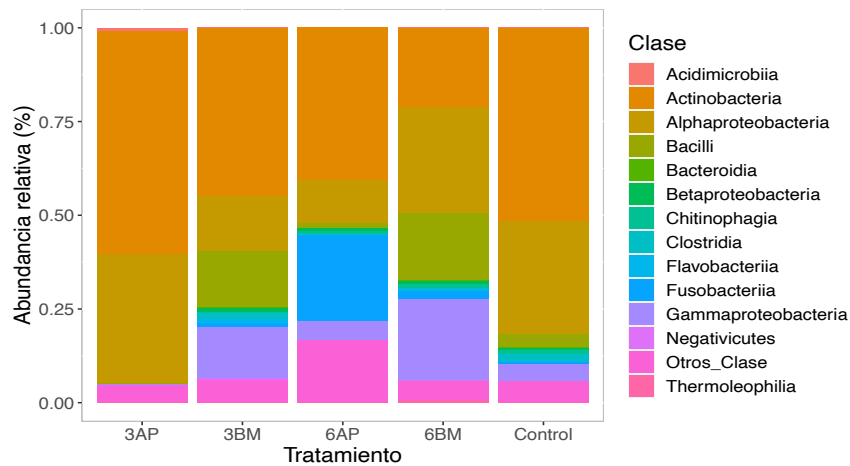
*Actinobacteria* fue el filo más abundante con un promedio de (44.92%) seguido de la *Proteobacteria* con un promedio de (38.76%) en todos los tratamientos experimentales. Las abundancias relativas más bajas se muestran con *Bacteroidetes* (1.31%) y con otros phylum (0.67%) donde se encuentra *Acidobacteria*, *Cyanobacterias*, entre otros. Se encontraron diferencias significativas de *Firmicutes* ( $p < 0.05$ ) en comparación con las otras comunidades bacterianas.



**Figura 7.** Abundancia relativa de las comunidades bacterianas (phylum) presentes en el tejido intestinal de tilapias colectadas el día 30 del bioensayo, las cuales estuvieron bajo cinco dietas experimentales compuestas por AP, BM y HP. (n=3)

Los resultados obtenidos respecto a las comunidades bacterianas a nivel Clase se observan en la Figura 8, donde *Actinobacteria* representa la clase más abundante con un promedio de (43.57%), seguido de *Alphaproteobacteria* (23.83%) y *Gammaproteobacteria* (9.04%), siendo esta última significativamente diferente ( $p= 0.02$ ) en comparación con el resto de las comunidades bacterianas.

El tratamiento control presentó mayor abundancia relativa con *Actinobacteria* (51.72%) y *Alphaproteobacteria* (30.15%), mientras que el tratamiento 6AP presentó abundancia relativa con *Actinobacteria* (40.76%), *Fusobacteria* (23.02%), *Alphaproteobacteria* (11.51%). La BM presentó una alta diversidad con *Gammaproteobacteria* y *Bacilli*.

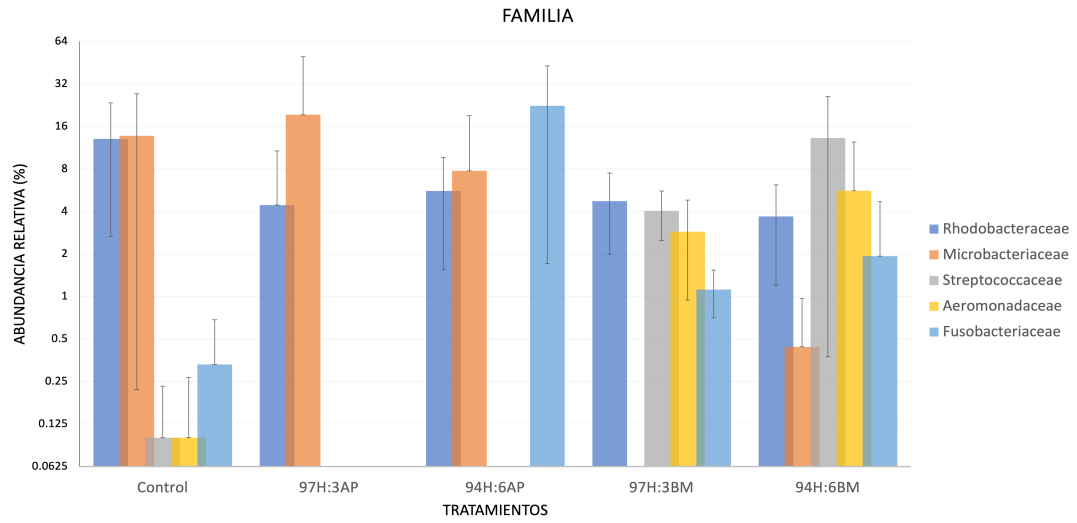


**Figura 8.** Comunidades bacterianas a nivel de Clase obtenidas de las muestras de intestino de la tilapia tomada el día 30 del bioensayo que estuvieron bajo cinco dietas experimentales (n=3).

La abundancia relativa a nivel de Familia registró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en *Streptococcaceae*, *Microbacteriaceae* y *Aeromonadaceae*. El grupo bacteriano más abundante en el intestino de la tilapia fue la familia de los *Microbacteriaceae* (8.27%) en todos los tratamientos (Figura 9).

Se observó poca abundancia de comunidades bacterianas en el tratamiento 3AP (Figura 9). Los tratamientos con AP presentaron abundancia relativa de *Rhodobacteraceae* y *Microbacteriaceae*, mientras que los tratamientos con BM presentaron las cinco familias excepto para el tratamiento con 3BM donde no existió la presencia de la bacteria *Microbacteriaceae*.





**Figura 9.** Comunidades bacterianas de los cinco tratamientos experimentales a nivel de Familia obtenidas de muestras de intestino de tilapia del día 30 del bioensayo, representadas mediante un gráfico de barras.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 RENDIMIENTO PRODUCTIVO DE LA TILAPIA

Constantemente la acuicultura continúa creciendo, por lo que el uso de fuentes alternativas y sostenibles de proteínas en los alimentos acuícolas será indispensable. Recientemente, hay un gran interés en reemplazar la harina de pescado (HP) con fuentes de proteína alternativas, encontrándose la cianobacteria *A. platensis* (Spirulina) (Hirahashi *et al.*, 2002; Pakravan *et al.*, 2016; Siringi *et al.*, 2021) y las biomásas microbianas (Chand *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2021; Gamboa-Delgado *et al.*, 2022; Vesilaki *et al.*, 2023) como algunos de los grupos más estudiados actualmente. En el presente trabajo, se evaluó la AP y una BM (ProFloc™ por Nutrinsic®) con diferentes niveles de inclusión en la dieta a nivel aditivo para la tilapia del Nilo (*O. niloticus*).

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas de los tratamientos experimentales después de 30 días de bioensayo ( $p > 0.05$ ) en los tratamientos experimentales. Sin embargo, se pudo observar un mayor peso final, GP, TC y FCA en las tilapias que recibieron dietas con una incorporación del 3% comparada con las de 6%, sin mostrar diferencias significativas. Estos resultados concuerdan con Plaza *et al.* (2018) quienes tampoco encontraron diferencias significativas en GP y FCA, después de añadir 1% de *A. platensis* a una dieta comercial para la tilapia del Nilo. Lo mismo ocurrió en un estudio con Lubina europea, *Dicentrarchus labrax*, donde se utilizaron tres tipos de proteínas unicelulares (bacteriana, levadura y algas) con diferentes niveles de inclusión (12%, 15% y 18%), no obstante, los niveles con 12% y 15% mostraron un mayor peso final y GP, dando como resultado un mejor rendimiento comparado con los grupos control y con los de 18%, sin embargo, no hubo diferencias significativas (Vasilaki *et al.*, 2023).

En un estudio realizado en camarón *Litopenaeus vannamei*, Gamboa-Delgado *et al.* (2020) utilizaron de igual forma la BM ProFloc™ a niveles aditivos donde no encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento control, sin embargo, el peso final, GP y TCE fueron mayores al incorporar 4% en la dieta.

En cambio, Velásquez *et al.* (2015) obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en peso final, GP y TCE al incorporar 30% de *A. platensis* en la tilapia. Del mismo modo en un estudio con bagre híbrido amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*♀ x *Pelteobagrus vachelli*♂) existió un aumento del crecimiento al incorporar 1% de Spirulina (Xia *et al.*, 2021). En cuanto a la BM, Yossa *et al.* (2021) trabajando con tilapia tuvieron como resultado que la sustitución del 100% de la harina de pescado con DY-Pro (*Saccharomyces cerevisiae*, una levadura que se produce a base de la fermentación de etanol de maíz disminuyó la ingesta de alimento y mejoró el FCA.

En el presente estudio, a medida que los niveles de inclusión de Spirulina y biomasa se incrementaron al 6%, los parámetros de crecimiento disminuían numéricamente (sin alcanzar significancia estadística). En un estudio nutricional realizado en besugo (*Acanthopagrus schlegelii*), Xu *et al.* (2021) sustituyeron la harina de pescado con una harina de bacterias *Methylococcus capsulatus* de Feedkind® y no encontraron diferencias al incorporar 4.13%. En cambio, con 8.27%, encontraron diferencias significativas en GP, TCE comparadas con la dieta control. Similares resultados fueron reportados en un estudio realizado por Al-Zayat *et al.* (2019) al utilizar AP en tilapia. Se considera que una de las razones es debido a la palatabilidad de la dieta, ya que se promueve la ingesta de los alimentos.

Se ha comprobado que las sustancias de bajo peso molecular (<1.000 Da) como los aminoácidos y los nucleótidos pueden estimular las células sensoriales olfativas y gustativas de los peces (Gamboa-Delgado *et al.*, 2022). Se ha encontrado también, que los microorganismos tienen un alto contenido de nucleótidos que los convierte en agentes palatables (Gamboa-Delgado y Márquez-Reyes, 2018).

En un estudio donde incorporaron 0, 4.0, 8.0 y 12.0 g de Spirulina/kg de dieta para la tilapia, encontraron que al alimentar con 8.0 g de spirulina/kg de dieta tuvieron un mejor rendimiento comparado con 12.0 g de spirulina/kg, este resultado se pudo deber a que la dureza de los gránulos aumentó con la cantidad de Spirulina, haciéndolo menos palatable (Siringe *et al.*, 2021). Dohaish *et al.* (2018) incorporaron 5%, 20%, 35% y 50% de AP, y registraron el mejor peso final, GPF, FCA, TCE de la tilapia con 5%. En un estudio con

dos especies de camarones *Litopenaeus vannamei* y *L. schmitti* la incorporación de Spirulina en pequeñas adiciones ayudó como atrayente alimenticio (Jaime Ceballos *et al.*, 2007).

Se conoce que la Spirulina carece de celulosa lo que la hace más digerible para los peces (Soni *et al.*, 2017; Dohaish *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha comprobado que a mayor incorporación de la *A. platensis* comienza a existir una deficiencia en aminoácidos. En particular arginina, lisina y treonina, lo cual se observó en un estudio con camarones, *L. vannamei* (Zhou *et al.*, 2013). De esa misma forma con bagre amarillo, *Pelteobagrus fulvidraco* se reportó una deficiencia de lisina, metionina e histidina (Liu *et al.*, 2019).

Asimismo, se comprobó que al alimentar con 80% y 100% de Spirulina en bagre amarillo se obtuvo menor TC y el contenido lipídico fue significativamente menor que el control, esto sucedió debido a que *A. platensis* contiene polifenoles, que en altas cantidades podrían ocasionar hipolipidemia (Liu *et al.*, 2019).

Los resultados observados en el presente estudio de los niveles adecuados de la AP y BM pueden variar dependiendo de la especie, la edad, la composición de la dieta y las prácticas de alimentación (Dohaish *et al.*, 2018). Durante este estudio se pudo observar que el peso inicial promedio de los organismos ( $0.8 \pm 0.01$  g) pudo contribuir a que no se observaran diferencias significativas en los parámetros de crecimiento en los 30 días del bioensayo. Esto concuerda con los hallazgos encontrados por Dohaish *et al.* (2018) en alevines de tilapia con un peso inicial de  $1.3 \pm 0.06$  g en una prueba con duración de 90 días. Asimismo, en otros estudios con alevines de tilapia (Plaza *et al.*, 2018; Al-Hafedh y Alam, 2013) y con camarón *L. vannamei* (Pakravan *et al.*, 2016).

La BM derivada de la fermentación del gas natural con *Methylococcus capsulatus* ayudó a reducir la oxidación de lípidos y la proporción de grasa magra en pollos de engorde. Asimismo, en cerdos con (41% BM) y en el salmón Atlántico con (52% de BM) se reemplazó la HP sin afectar el crecimiento (Overland *et al.*, 2010). De igual modo Chand *et al.* (2014) reportaron que con el mayor porcentaje de sustitución de la HP por una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, obtuvieron el mayor peso final en pollos de engorde.

## 8.2 ISÓTOPOS ESTABLES

### 8.2.1 CAMBIOS ISOTÓPICOS Y FACTORES DE DISCRIMINACIÓN

En el presente estudio de investigación, se utilizaron como aditivos BM y AP en cuatro dietas experimentales con harina de pescado como principal ingrediente. Los valores isotópicos de las dietas se reflejaron rápidamente en el tejido muscular de la tilapia y los cambios isotópicos en los diferentes tratamientos siguieron una tendencia similar en el tiempo, posiblemente debido al alto nivel de harina de pescado y a la baja inclusión de los ingredientes aditivos experimentales. La evaluación de tales dinámicas isotópicas en ingredientes, dietas y tejido muscular, permitió eventualmente estimar la asimilación de los ingredientes experimentales e inferir acerca de algunos parámetros metabólicos de los peces.

El equilibrio isotópico entre dietas y tejido se alcanzó entre los días 15 y 18 para  $\delta^{15}\text{N}$  y entre el día 15 y 22 para  $\delta^{13}\text{C}$ . Las tilapias alimentadas con inclusión del 6% de aditivos microbianos en la dieta (94H:6AP y 94H:6BM) promovieron menor discriminación isotópica en relación con el tratamiento control en cuanto a carbono, mientras que con nitrógeno solo se observó menor factor de discriminación con la dieta (94H:6AP); sin embargo, no existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

El nivel óptimo de proteínas en la dieta de los peces depende de la digestibilidad, la calidad y composición de aminoácidos en la proteína, la temperatura, el nivel de alimentación, el sistema de cultivo, la etapa y el tipo de especie (Gaye-Siessegger *et al.*, 2004). De tal manera, para el presente estudio, se establecieron cinco dietas experimentales que fueran isonitrogenadas ( $40.5 \pm 2.07\%$ ).

Aunque no se pudieron observar diferencias significativas entre los valores de discriminación con carbono y nitrógeno en los tratamientos experimentales, se conoce que los cambios se deben a las diferentes vías metabólicas que siguen los componentes nutricionales y sus respectivos isótopos (Therrien *et al.*, 2011). El factor de discriminación isotópica ha sido propuesto como un indicador que ayuda a conocer la calidad nutricional

de las dietas, ya que menores valores se han asociado a mejor calidad/cantidad de proteína (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009; Barreto-Curiel *et al.*, 2018).

Al final del bioensayo se encontró que los valores  $\Delta^{13}\text{C}$  entre músculo y organismo para la dieta control fue de 2.56 ‰ y para  $\Delta^{15}\text{N}$  fue de 2.68 ‰, siendo muy similares para las demás dietas. La literatura reporta que en la mayoría de los organismos el  $\Delta^{13}\text{C}$  aumenta alrededor del 0.4-1.0 ‰ y  $\Delta^{15}\text{N}$  entre 2.5 – 3.5 ‰ a medida que va subiendo el nivel trófico (Therrien *et al.*, 2011). También se conoce que factores como la baja digestibilidad, cantidad inadecuada de proteínas y aminoácidos de las dietas puede aumentar el factor de discriminación. Se ha reportado que las combinaciones de fuentes de proteínas pueden producir un mayor crecimiento, pero con un alto enriquecimiento proteico (Barreto-Curiel *et al.*, 2018).

A nivel fisiológico existen diferentes vías metabólicas que se activan a diferentes niveles de alimentación. A nivel de mantenimiento, el catabolismo y el anabolismo se equilibran entre sí. Mientras que, si el nivel de alimentación aumenta, la relación de anabolismo y catabolismo cambia. Gaye-Siessegger *et al.* (2007) reportaron que en tilapia del Nilo los valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  disminuyeron de una manera no significativa con el aumento de alimentación, debido a que fisiológicamente comenzó a existir la síntesis de nuevos ácidos grasos. Hallazgos similares se registraron en un estudio con tilapia donde midieron diferentes contenidos de proteínas (Gaye-Siessegger *et al.*, 2004).

Si hubiera ocurrido lo contrario y existieran cambios tróficos con valores superiores a 3 ‰, se reflejaría que los organismos presentan una dieta deficiente de proteína, ya que a nivel fisiológico reciclan los grupos amino de las proteínas para sintetizar nuevos aminoácidos, utilizando los esqueletos de carbono de los carbohidratos y lípidos (Gaye-Siessegger *et al.*, 2004). Por ejemplo, en un estudio realizado con búho nevado, se analizaron los valores  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  del músculo de ratón (alimento de los búhos) y de la sangre de los búhos. Después de 6 semanas, los valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  y  $\Delta^{15}\text{N}$  de la sangre de los búhos registró entre +0.3‰ y +1.9‰, respectivamente, siendo estos valores menores a los establecidos por la literatura (Therrien *et al.*, 2011).

### **8.2.2 NITROGENO Y CARBONO: TIEMPO MEDIO EN TEJIDO MUSCULAR**

Los valores isotópicos de carbono y nitrógeno ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) determinados en el tejido muscular de los peces, se incorporaron en un modelo exponencial de cambio isotópico (Fry, 2008; Hesslein *et al.*, 1993), a partir del cual se estimó que los tiempos medios de residencia del nitrógeno y carbono en el tejido muscular oscilaron entre 6.6 – 4.9 d. Estos resultados indican que, para nitrógeno, entre menor sea el tiempo de residencia, mayor tiende a ser la tasa metabólica ( $m$ ), al igual que la tasa de crecimiento ( $k$ ), sucediendo lo contrario con los valores altos de  $t_{50}$ . Hallazgos similares se observaron en un estudio realizado con camarones donde varias dietas se formularon a base de proteína de soya y gluten de maíz (Gamboa-Delgado *et al.*, 2013). El modelo de Hesslein, ayuda a estimar los valores  $t_{50}$  y para a su vez conocer la semivida del nitrógeno y carbono en el tejido muscular (Barreto-Curiel *et al.*, 2018).

En peces que se encuentran en crecimiento ( $k$ ), el principal factor causante del cambio isotópico es la obtención de masa muscular (García-Pérez *et al.*, 2022), y en segundo término se encuentran las tasas de recambio metabólico ( $m$ ). Por lo que al obtener una  $k$  alta se puede atribuir a una combinación de mayores tasas de rotación de proteína y una menor proporción de energía utilizada por el metabolismo (Barreto-Curiel *et al.*, 2018).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos al comparar las proporciones  $k$  y  $m$  tanto para  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ . Dichos resultados, no se pueden relacionar con el factor de discriminación ( $\Delta^{13}\text{C}$  y  $\Delta^{15}\text{N}$ ), ya que los valores más altos reflejarían una menor eficiencia.

En un estudio realizado por Barreto-Curiel *et al.* (2018) se reportó que en juveniles del pez marino *Tototaba macdonaldi* a un mayor contenido proteico en la dieta, se observaba un aumento de  $\Delta^{15}\text{N}$  entre músculo y dieta. En la presente investigación, se observó que con una inclusión del 3% de aditivos de origen microbiano en la dieta se obtuvieron mayores tasas de crecimiento y ganancia de peso, así como una tasa de rotación metabólica y  $k$  alta, sin embargo, la tasa de recambio metabólica fue menor debido a que los organismos se encuentran en crecimiento.

La dieta control, cuyo contenido era 100 H como fuente de proteína, promovió un  $t_{50}$  que fue mayor al causado por el resto de los tratamientos. Esto se puede atribuir a que la harina de pescado presenta mayor digestibilidad y el perfil de aminoácidos es el adecuado para la tilapia del Nilo, por lo tanto, promueve un rápido crecimiento. Zhou y Gu (2020) aplicaron las mismas técnicas en la tilapia y reportaron vidas medias más cortas  $t_{50}$  causadas por las dietas que promovieron los mejores parámetros de crecimiento.

Esta incorporación selectiva se puede deber a que existió una mayor eficiencia por AP, ya que se conoce que la Spirulina es palatable y carece de celulosa (Soni *et al.*, 2017). En el presente estudio, el  $t_{50}$  observado en los peces bajo el efecto de todas las dietas experimentales se puede deber a que existe una rápida ingestión, digestión, y asimilación de los nutrientes (Castañeda-Solís, 2013).

### ***8.2.3 APORTES DE NUTRIENTES DE LA HARINA DE PESCADO, ARTHROSPIRA PLATENSIS Y BIOMASA MICROBIANA***

Al analizar los resultados de las contribuciones nutricionales al crecimiento de la tilapia del Nilo alimentada con las diferentes dietas experimentales, se observó que fueron estadísticamente similares a las proporciones de nutrientes disponibles en las dietas. Esto permitió inferir que existió una transferencia equivalente de carbono y nitrógeno (aminoácidos y proteínas) provenientes de la dieta control (H) y los dos ingredientes aditivos (AP y BM). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la dieta 94H:6BM donde la cantidad asimilada de nitrógeno aportado por la harina de pescado fue mayor (5% más) que la aportada por la BM. Con el suministro de carbono en el tejido muscular sucedió lo contrario, ya que fue menor el aportado por la harina de pescado (15%) y mayor para BM.

Investigaciones anteriores han reportado que en dietas para trucha arco iris a base de Spirulina se necesita suplementar metionina y lisina, mientras que al incorporar una biomasa microbiana existen hallazgos que demuestran una reducción del crecimiento en peces que reciben mayores proporciones de BM debido a afectaciones en la palatabilidad, disminución de la absorción de N y aumento de la excreción de urea debido al alto contenido de nucleótidos en la BM (Gamboa-Delgado y Márquez-Reyes, 2016).



Asimismo, estudios previos con microalgas *Schizochytrium* y *Grammatophora* reportaron contribuciones de nitrógeno equivalentes a las proporciones suministradas en las dietas (Alvarado-Ibarra, 2019). En el presente estudio se pudo observar que la dieta (94H:6AP) promovió una mejor proporción de C y N incorporado en músculo. También se reportó que la inclusión con 6% AP generó un menor factor de discriminación entre las dietas y los peces, siendo que la AP contiene alrededor del 47% de aminoácidos del peso total de la proteína (Soni *et al.*, 2017). En otro estudio donde se utilizó harina de agregados bacterianos (Biofloc B) derivados en un cultivo de la tilapia para formular una dieta en proporción 50HP:50B, se observó que la contribución al tejido muscular de camarones fue 59% de nutrientes aportados por la harina de pescado y de 41% a partir del biofloc (Gamboa-Delgado *et al.*, 2017).

### **8.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES**

En años recientes, existe una creciente preocupación por la posible degradación de los ambientes acuáticos debido a la contaminación química (Costa *et al.*, 2011). En el presente estudio se buscó lograr una comprensión más profunda de los efectos en la tilapia mediante los biomarcadores enzimáticos a través de un desafío con diésel, que ha sido utilizado en estudios anteriores para identificar el modo de acción de los xenobióticos (González *et al.*, 2015).

Se considera que el hígado es el principal órgano metabolizante en los peces, con mayores cantidades de enzimas CYP1A que otros tejidos (Costa *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este estudio para la enzima de fase I (CE) indica que existió una actividad enzimática diferente en los peces a los que se les inyectó diésel (D+DC, D+3AP, D+6AP, D+3BM y D+6BM), comparado con los tratamientos control compuestos por Aceite (A). Esto concuerdan con un estudio realizado por González *et al.* (2015) en catán, *Atractosteus spatula* en el que existió mayor actividad en tres enzimas esterases (CE, AChE, BChE) al exponer a los peces a diazinona durante dos días.

Sin embargo, se debe recordar que los compuestos que entran al organismo sufren una transformación por el sistema enzimático de la fase I, lo que concuerda con los resultados

obtenidos al exponer a las tilapias con diésel. De esa misma forma se pudo observar que el tratamiento con una incorporación del 6% AP no presentó diferencias significativas con su dieta control (O+6AP) ( $p=1.00$ ). Este posible hallazgo se puede deber a que un factor potencial interespecífico de CE, es la dieta (Ribalta *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Mabrouk *et al.* (2021) encontraron que los niveles de glucosa disminuyeron en tilapias alimentadas con Spirulina. La glucosa es uno de los índices más sensibles del estado de estrés de los organismos: sus altas concentraciones indican aumento de cortisol, lo que genera la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis y glucogenólisis (Firat *et al.*, 2011). Se conoce que la Spirulina contiene abundantes carotenoides y fitopigmentos (ficobilinas, xantofilas y ficocianinas) que actúan como sustancias antioxidantes naturales, lo que pudo ocasionar que a niveles altos de AP junto con diésel (D+6AP) se contrarrestara la respuesta enzimática (Mabrouk *et al.*, 2021). Sin embargo, se necesitarían realizar más investigaciones para comprobar dichos hallazgos.

Por otro lado, los resultados obtenidos para la enzima de desintoxicación fase II, GST, se pudo observar que los tratamientos con diésel (D) provocaron actividad enzimática mayor con respecto a sus tratamientos control con aceite (A). Sin embargo, esta actividad enzimática no se observó en los tratamientos que contenían BM, probablemente debido a que se ha reportado que las biomasas bacterianas contienen un efecto osmoprotector, en el cual se encuentra involucrada la ectoína que promueve una protección ante un estresor (Matassa *et al.*, 2016).

El aumento de la GST en los tratamientos con diésel (D+DC, D+3AP, D+6AP) se debe a que la mayoría de los compuestos que entran al cuerpo sufren una transformación por el sistema enzimático de la fase I, permitiendo una conjugación posterior con enzimas de la fase II, como el radical glutatión (GSH) por actividad de GST, que convierte los compuestos hidrofóbicos en hidrofílicos, para ser excretados más fácilmente (González *et al.*, 2015).

Estos resultados se asemejan a un estudio realizado por García-Pérez *et al.* (2019) donde evaluaron la eficacia de la curcumina y el ácido linoleico conjugado en la protección contra aflatoxinas en camarón *Litopenaeus vannamei*. Las dietas contaminadas mostraron

actividad enzimática tanto para GST y ALP. También se ha demostrado que en en *O. niloticus* expuestas con diésel puro y biodiésel durante 2 y 7 días con concentraciones de 0.01 y 0.1 ml L<sup>-1</sup> en el agua, ocurre un aumento de la actividad de GST en el día 7 (Nogueira *et al.*, 2011). En el presente estudio, los alevines de tilapia se expusieron al diésel a través de una inyección intraperitoneal (20 µl/kg) por lo que la actividad se pudo observar de forma más rápida a las 24 h.

Otro estudio con juveniles de sábalo barrero, *Prochilodus lineatus*, indicó diferencias significativas al ser expuestos con diésel (Simonato *et al.*, 2007). Sin embargo, esto contradice un estudio realizado por Costa *et al.* (2011) quienes expusieron la tilapia con benzopireno (Bp) y demostraron una mayor metabolización en branquias y el intestino, reduciendo la cantidad Bp en hígado. Los resultados sobre el uso de la GST como biomarcador de la exposición a contaminantes no son todavía muy claras, ya que va a depender de la especie, el xenobiótico, edad y duración de la exposición (Costa *et al.*, 2011). González *et al.* (2015) observaron una reducción de la actividad enzimática de GST al exponer catanes a 17 B-estradiol (E2) y B-Naftalina (BNF).

En cuanto a la enzima hepatopancreática ALP, implicada en la desintoxicación, su incremento en hígado se observa cuando necesita metabolizar grandes cantidades de xenobióticos (Tapia-Salazar *et al.*, 2022). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio con ALP, no son concluyentes, ya que se observó que el tratamiento (D+3AP y D+6BM) presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a los demás tratamientos. Una posible explicación es que la baja inclusión de AP (3%), ofreció menor protección al daño hepático, comparada con los efectos de la dieta 6AP. Sin embargo, Molina *et al.* (2005) investigaron el efecto de las microcistinas de las cianobacterias en tilapia y observaron un aumento de la actividad ALP en hígado.

La futura aplicación de estudios bioquímicos podría indicar la razón por la que existió un aumento de la actividad con D+3AP. En cuanto a la BM sucedió lo contrario, a mayor cantidad de BM, es decir, con 6BM existió un mayor daño hepático al ser expuestas con diésel. Por otro lado, en un estudio donde se expusieron las tilapias a plomo y cobre, se observó que a los 21 días de exposición tuvieron mayor actividad ALP con respecto a los

4 días (Firat *et al.*, 2011), por lo que, en este estudio al estar expuestos solamente por un período de 24 h, las afectaciones fisiológicas y metabólicas no se reflejaron completamente.

#### 8.4 CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LA TILAPIA

La microbiota intestinal reviste tal importancia, que también se le conoce como el segundo genoma, ya que interviene en la salud de los organismos, afecta el crecimiento y la función inmune (Plaza *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020). La microbiota intestinal juega un papel importante en la absorción de nutrientes; donde la dieta es el principal factor que afecta el metabolismo y la composición intestinal (Al Mahrouqi *et al.*, 2023). Los peces se ven expuestos a enfermedades que podrían alterar la homeostasis intestinal dando como resultado la aparición de patógenos oportunistas (Wu *et al.*, 2020).

Este estudio se centró en investigar la abundancia relativa de las comunidades microbianas en el intestino de la tilapia del Nilo a partir de la secuencia de la región V3 del ARNr 16S alimentadas *ad libitum* durante 30 días con dietas con harina de pescado, Spirulina y una biomasa microbiana comercial (ProFloc™).

Los resultados indicaron que los filos *Actinobacteria* (44.92%) y *Proteobacteria* (38.76%) fueron los dos grupos más abundantes en todos los tratamientos experimentales. Estudios previos han demostrado que la *Proteobacteria* es el filo dominante en el intestino de los alevines de tilapias que provienen de la acuicultura (Zheng *et al.*, 2020; Berded *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2021; Al Mahrouqi *et al.*, 2023). Se conoce que estas bacterias Gram (-) tienen la función de proteger contra microorganismos anaerobios estrictos que consumen oxígeno y reducen el potencial de redox, manteniendo así la función del sistema inmune en la mucosa intestinal (Bereded *et al.*, 2021).

En un estudio reciente se realizó la comparación entre un sistema de cultivo y el de un lago, y se encontró que en el sistema de cultivo habían predominado los Filos *Proteobacteria* y *Cyanobacteria*, mientras que en peces colectados en el lago se encontraron *Firmicutes* y *Fusobacteria* (Bereded *et al.*, 2021). En este estudio, el tratamiento control tuvo representación amplia de los Filos *Proteobacteria*,

*Actinobacteria*, *Firmicutes*, y *Fusobacteria*, lo que concuerda con Martínez-Porchas et al. (2023) quienes hallaron que la microbiota de la tilapia estuvo representada por los mismos Filos.

Filos predominantes en los tratamientos experimentales con AP estuvieron compuestos por *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Fusobacteria*, donde no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), sin embargo, el tratamiento con 6AP presentó mayor diversidad de *Fusobacteria* (23.02%). Los resultados anteriores son similares a los reportados en un estudio con tilapia modificada genéticamente (NEW GIFT, por sus siglas en inglés), donde se reportó la misma diversidad Filos en la microbiota del intestino de la tilapia (Plaza et al., 2018). Asimismo, Plaza et al. (2018) encontraron mayor diversidad con los Filos *Fusobacteria* y *Proteobacteria* al alimentar con 3AP a la tilapia del Nilo. Por otro lado, en un estudio realizado por Huang et al. (2023) encontraron mayor diversidad bacteriana intestinal a los 30 días del bioensayo al alimentar con 2% de *Chlorella vulgaris*, en el presente estudio, cuando se alimentó con 3% y 6% de AP se encontró que con 6% existió mayor abundancia relativa con *Fusobacteria* a los 30 días del bioensayo.

Se conoce que los *Bacteroidetes* participan en el metabolismo de las proteínas, así como en el transporte de los hidratos de carbono que ayudan a la digestión de los peces. En el tratamiento con 6AP se encontró la presencia del Filo *Bacteroidetes* (1.39%) en comparación con 3AP.

Por otro lado, en el tratamiento experimental con BM, se encontró que los Filos más observados fueron *Actinobacteria* y *Firmicutes*, donde existió diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Mientras que en el tratamiento con 6BM se obtuvo una mayor abundancia relativa con *Proteobacteria* (53.95%). Estos resultados se asemejan a un estudio realizado por Martínez-Porchas et al. (2023) en el cual evaluaron aditivos alimentarios, entre ellos biofloc y encontraron que el Filo *Proteobacteria* fue uno de los más representativos.

Cabe destacar que la abundancia relativa de *Firmicutes* fue mayor en los tratamientos experimentales con BM, comparada con los demás tratamientos. Se conoce que los microbios del Filo *Firmicutes* producen ácidos grasos de cadena corta que proporcionan nutrición a los enterocitos, adicionalmente son los encargados de controlar el entorno

microecológico intestinal (Wu *et al.*, 2021). En un estudio que se realizó con tilapia donde se tenía una biomasa microbiana a base de grano de cereal y levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) se observó una abundancia de microbios intestinales que mejoró el sistema inmune de los organismos acuáticos, entre ellos *β-Proteobacteria*; además de existir una reducción de la aparición de *Pseudomonas* (Ringo *et al.*, 2016).

Por otro lado, a nivel clase se encontró que la abundancia bacteriana relativa del contenido intestinal de todos los tratamientos estuvo compuesta por *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Fusobacteria* y *Gammaproteobacteria*, estos dos últimos encontrándose con mayor diversidad en el tratamiento con 6AP. Se conoce que la *Actinobacteria* inhibe el crecimiento de bacterias patógenas intestinales siendo beneficiosas en la microbiota intestinal (Wu *et al.*, 2021); la abundancia de estos microbios en los peces depende de la composición de los sedimentos y residuos de fauna en el agua.

Estudios previos mencionan que esta bacteria se enriquece debido a la presencia de prebióticos, entre ellos las paredes celulares de levaduras que presentan contenidos altos de beta-glucano, por lo que es posible argumentar que la presencia de AP en este estudio favoreció el crecimiento de esta bacteria. En el estudio realizado por Al Mahrouqi *et al.* (2023) encontraron que en tilapias alimentadas con Spirulina predominó el género *Hyphomicrobium* siendo un *Alphaproteobacteria* Gram (-) asociada con los peces.

La BM presentó una alta abundancia relativa de *Gammaproteobacteria* ( $P < 0.05$ ) y *Bacilli* a nivel de Clase. El tratamiento con 3BM presentó una diversidad de *Bacilli* del 15.03%, mientras que con 6BM presentó 17.89%. Se conoce que los probióticos se utilizan para prevenir enfermedades y mejorar la salud de los peces. La Clase *Bacilli* está compuesta por los *Bacillales* y *Lactobacillales*, estos bacilos son una de las cepas probióticas más comunes. Entre sus características resalta que tienen una baja toxicidad y producen sustancias antibióticas. Sin embargo, Al Mahrouqi *et al.* (2023) observaron la presencia de *Bacillus* al alimentar las tilapias con Spirulina, lo que contradice este estudio realizado ya que se encontró que la BM fue la que mayor *Bacillus* presentó.

Además, los resultados revelaron otras bacterias dentro de la clasificación de Clase entre ellos, *Bacteroidia*, *Betaproteobacteria*, *Chitiniphagia*, *Flavobacteriia* y *Thermoleophilia*. Dentro de la Clase de patógenos se encontró con mayor abundancia relativa *Clostridia* en el tratamiento control (2.12%) comparada con el resto de los tratamientos, estos resultados concuerdan con Al Mahrouqi *et al.* (2023) donde también obtuvieron la presencia de patógenos en su tratamiento control.

A nivel de Familia, se encontró *Rhodobacteraceae* presente en todos los tratamientos; estudios previos mencionan que este grupo de microorganismos se consideran como sustitutos antibióticos en la acuicultura en crustáceos y peces, mejorando el sistema inmune, capacidad antioxidante y el crecimiento (Martínez-Porchas *et al.*, 2023). En cuanto a *Streptococcaceae*, *Microbacteriaceae* y *Aeromonadaceae* se encontraron diferencias significativas entre sus abundancias ( $P < 0.05$ ). El tratamiento 6BM presentó mayor diversidad microbiana comparada con el control. Sin embargo, los tratamientos con BM presentaron el grupo de la Familia *Aeromonadaceae* y *Streptococcaceae*, consideradas bacterias oportunistas, los *Streptococcus* pertenecen al Filo *Firmicutes*. De tal forma que su abundancia en la microbiota podría promover enfermedades durante el sistema de cultivo si los organismos llegaran a estar inmunosuprimidos.

## 9. CONCLUSIONES

Los parámetros de crecimiento registrados en el presente estudio fueron similares entre tratamientos, lo que se atribuye a un buen desempeño nutricional de las diferentes dietas experimentales sobre el rendimiento de los peces. Sin embargo, los tratamientos con una inclusión con 3% tuvieron mejor crecimiento al comparar con el tratamiento control.

Se sugiere que la adición de *A. platensis* a la dieta de la tilapia debe limitarse a niveles bajos, ya que a niveles dietarios altos se han reportado restricciones de nutrientes que evitan el óptimo crecimiento de los alevines.

La adición de biomasa microbiana generó resultados similares con respecto a Spirulina, sin embargo, su incorporación a niveles dietarios más altos podría ser beneficiosa en el crecimiento de la tilapia, pero se tiene conocimiento que la palatabilidad es un factor que impide el consumo continuo y que exista un mayor aumento de la absorción de nitrógeno.

Los valores de cambio isotópico  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en las tilapias se mantuvieron similares desde el día 0 y promovieron un equilibrio isotópico entre dietas y consumidores.

Se determinó que, aunque los ingredientes experimentales se incluyeron a bajos niveles dietarios, en comparación a la harina de pescado, estos aportaron carbono y nitrógeno estructural a la biosíntesis de músculo en la tilapia.

Al igual que los resultados obtenidos con los parámetros zootécnicos, los tratamientos con una incorporación con 3% (AP y BM) fueron los que promovieron mejores tasas de crecimiento ( $k$ ), así como un alto recambio metabólico ( $m$ ), los cuales a su vez causaron menores tiempos medios de residencia ( $t_{50}$ ) del carbono y nitrógeno al comparar con el tratamiento control y los demás tratamientos.

El tratamiento 6AP resultó tener los mismos valores de “ $k$ ” y de  $t_{50}$  que el tratamiento control, lo que se puede atribuir a que este tratamiento resultaría ser un sustituto favorable para sustituir la harina de pescado a esta proporción causando el mismo beneficio que el tratamiento control.



La actividad de CE fue mayor en el inicio para todos los tratamientos, y fue significativamente mayor para el tratamiento con 6BM, al ser la primera enzima de fase I que actúa ante la exposición a diésel.

Los peces bajo el tratamiento con BM mostraron una actividad enzimática menor con la enzima de fase II, GST, lo que se atribuye a que contiene un efecto osmoprotector.

Las actividades de la enzima ALP no fueron muy contundentes debido a que se observaron diferentes niveles de actividad en los tratamientos.

En vista de lo anterior, se puede concluir que el tratamiento 3BM contribuyó en otorgar una protección hepática ante la exposición a diésel, sin embargo, se sugiere realizar estudios adicionales que permitan confirmar este hecho.

Los resultados obtenidos con metagenómica indicaron que las comunidades bacterianas en el tracto digestivo de las tilapias sometidas a los diversos tratamientos resultaron diferentes en cada uno. A nivel de filo, se encontró que el tratamiento control, obtuvo mayor diversidad de bacterias. Con respecto a BM, se encontró que, a mayor nivel aditivo de BM, se encontró mayor abundancia de *Firmicutes*. Mientras que, con AP, a mayor nivel aditivo de AP, existió mayor abundancia de *Fusobacteria*. Por otra parte, a nivel de Clase, el tratamiento control mantuvo la misma diversidad microbiana. Asimismo, la BM presentó la misma diversidad microbiana tanto para 3BM como para 6BM, sin embargo, a mayor aditivo de BM existió mayor abundancia relativa de las bacterias. La AP, presentó mayor diversidad de bacterias, siendo más predominante *Fusobacteria* en la 6AP. Por lo que se concluye, que el tratamiento control y el tratamiento con 6BM presentaron mayor diversidad microbiana lo que se atribuye a un microbiota más benéfica, lo que puede estar vinculado a los parámetros zootécnicos ya que de manera no significativa presentaron un mejor rendimiento, así como mejor protección ante la exposición a diésel.

## 10. PERSPECTIVA

- Una dieta adecuada con 3% de biomasa microbiana podría ser favorable para sustituir la harina de pescado a mayores proporciones, buscando una manera de que este ingrediente sea más palatable para el organismo.
- La incorporación dietaria de pequeñas cantidades de biomasa microbiana contribuye a un mejor rendimiento por parte de los alevines de tilapia.
- Estudios futuros de metagenómica contribuirían al crecimiento de la acuicultura, ya que el generar probióticos y prebióticos darían mejores resultados en los parámetros productivos.
- La continuación de estudios nutricionales apoyados por técnicas metagenómicas tiene alto potencial para contribuir al crecimiento de la acuicultura.
- En los estudios enzimáticos se necesitan más conocimientos sobre las enzimas xenobióticos desintoxicantes en las especies de producción para poder evaluar los efectos que hoy en día se presentan por la contaminación ambiental.
- La búsqueda constante de ingredientes como sustituto parcial o completo de la harina de pescado en la tilapia contribuye a la disminución de los costos de producción.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Tawwab, M., & Ahmad, M. H. (2009a). Live Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 40(9), 1037–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x>
- Abdel-Tawwab, M., & Ahmad, M. H. (2009b). Effect of dietary protein regime during the growing period on growth performance, feed utilization and whole-body chemical composition of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 40(13), 1532-1537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02254.x>
- Al Mahrouqi, H., Dobretsov, S., & Abdala-Daz, R. T. (2023). The effect of Spirulina (*Arthrospira platensis*) feed supplement on proteins, lipids, carbohydrates, and microbiota of juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Applied Environmental Biotechnology*, 8(1), DOI: 1-8. 10.26789/AEB.2023.01.001
- Al-Hafedh, Y. S., & Alam, A. (2013). Replacement of fishmeal by single cell protein derived from yeast grown on date (*Phoenix dactylifera*) industry waste in the diet of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Journal of Applied Aquaculture*, 25(4), 346-358. 10.1080/10454438.2013.852419
- Al-Zayat, M.A. (2019). Effect of various levels of Spirulina (*Arthrospira platensis*) as feed supplement on growth performance, feed utilization, immune response and hematology of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(3), 361-370. DOI: 10.21608/EJABF.2019.54036
- Alagawany, M., Taha, A. E., Noreldin, A., El-Tarabily, K. A., & Abd El-Hack, M. E. (2021). Nutritional applications of species of Spirulina and Chlorella in farmed fish: A review. *Aquaculture*, 542, 736841. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736841>
- Ali, S. M., Aboseif, A. M., Gaafar, A. Y., El-Gamal, A. D., & El-hammady, A. K. (2022). Microbial Biomass Integrated with Sugarcane Wastes is a Proper Nutritive Supply for Nile Tilapia. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(4). <https://doi.org/10.54319/jjbs/150409>

- Ali, T. E. S., Martínez-Llorens, S., Moñino, A. V., Cerda, M. J., & Tomás-Vidal, A. (2016). Effects of weekly feeding frequency and previous ration restriction on the compensatory growth and body composition of Nile tilapia fingerlings. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(3), 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.06.004>
- Alvarado Ibarra, A. G. (2019). Aplicación de isótopos estables de nitrógeno para determinar el aporte nutricional de harina de pescado y biomasa de microalgas *Schizochytrium* y *Grammatophora* al crecimiento del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* [Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León]. *Biblios-e Archivo*.
- AOAC (1995). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Barreto-Curiel, F., Focken, U., D'Abramo, L. R., Cuarón, J. A., and Viana, M. T. (2018). Use of isotopic enrichment to assess the relationship among dietary protein levels, growth and nitrogen retention in juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 495, 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.001>
- Bereded, N. K., Abebe, G. B., Fanta, S. W., Curto, M., Waidbacher, H., Meimberg, H., and Domig, K. J. (2021). The impact of sampling season and catching site (Wild and aquaculture) on gut microbiota composition and diversity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biology*, 10(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/biology10030180>
- Bereded, N. K., Curto, M., Domig, K. J., Abebe, G. B., Fanta, S. W., Waidbacher, H., and Meimberg, H. (2020). Metabarcoding analyses of gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from lake Awassa and lake Chamo, Ethiopia. *Microorganisms*, 8(7), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071040>
- Bin Dohaish, E., Al Dhahri, M., & Omar, H. (2018). Potential application of the blue-green alga (*Spirulina platensis*) as a supplement in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis*

- niloticus). *Applied Ecology & Environmental Research*, 16(6).  
10.15666/aeer/1606\_78837902
- Bin Dohaish, E., Al Dhahri, M., y Omar, H. (2018). Potential application of the blue-green alga (*Spirulina platensis*) as a supplement in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Applied Ecology & Environmental Research*, 16(6). DOI:  
[http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1606\\_78837902](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1606_78837902)
- Bordner, C. E., D'abramo', L. R., and Conklin, D. E. (1983). Assimilation of nutrients by cultured hybrid lobsters (*Homarus sp.*) Fed experimental diets. *J. World Maricul. SOC*, 14, 24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1983.tb00056.x>
- 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(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carvalho, C. dos S., Bernusso, V. A., Araújo, H. S. S. de, Espíndola, E. L. G., and Fernandes, M. N. (2012). Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 89(1), 60–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.013>
- Castañeda Solis, J de D. (2013). Evaluación isotópica de la contribución nutricional de harina de subproductos avícolas y harina de pescado al crecimiento del camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* [Tesis licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León]. *Biblios-e Archivo*.
- Chand, N., & Khan, R. U. (2014). Replacement of Soybean Meal with Yeast Single Cell Protein in Broiler Ration: The Effect on Performance Traits. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(6).
- Cherel, Y., Hobson, K. A., and Hassani, S. (2005). Isotopic discrimination between food and blood and feathers of captive penguins: implications for dietary studies in the wild. *Physiological and biochemical zoology*, 78(1), 106-115.
- Cho, C. Y., Slinger, S. J., and Bayley, H. S. (1982). "Bioenergetics of salmonis fishes" energy intake, expenditure, and productivity. In *Biochem. Physiol* (Vol. 73, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90198-5)

- Choubert Jr, G., De La Noüe, J., and Luquet, P. (1979). Continuous quantitative automatic collector for fish feces. *The Progressive fish-culturist*, 41(2), 64-67. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1979\)41\[64:CQACFF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1979)41[64:CQACFF]2.0.CO;2)
- CONABIO. (2014). *Oreochromis niloticus*. México. [http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/LI007\\_Anexo\\_10\\_Ficha\\_Oreochromis\\_niloticus.pdf](http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/LI007_Anexo_10_Ficha_Oreochromis_niloticus.pdf)
- CONAPESCA (2017). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2017. México, SAGARPA. [https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO\\_ESTADISTICO\\_2017.pdf](https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf)
- CONAPESCA (2022). Prevé Agricultura crecimiento de 5.3 por ciento en producción pesquera y acuícola del país, al sumar 1.9 millones de toneladas en 2021. México. <https://www.gob.mx/inpi/prensa/preve-agricultura-crecimiento-de-5-3-por-ciento-en-produccion-pesquera-y-acuicola-del-pais-al-sumar-1-9-millones-de-toneladas-en-2021-292031?idiom=es>
- CONAPESCA. (2021). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Obtenido de Estadística de acuicultura y pesca relativa a los principales aspectos económicos y sociales. [https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2021/ANUARIO\\_ESTADISTICO\\_DE\\_ACUACULTURA\\_Y\\_PESCA\\_2021.pdf](https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2021/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_ACUACULTURA_Y_PESCA_2021.pdf)
- Costa, J., Ferreira, M., Rey-Salgueiro, L., y Reis-Henriques, M. A. (2011). Comparision of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 84(10), 1452–1460. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.046>
- Cruz-Valdez, J.C. (2005). Efecto de la inclusión de biomasa pigmentada (*Xanthophyllomyces dendrorhous* y *Saccharomyces exiguus*) en dietas experimentales para tilapia (*Oreochromis niloticus*) y su tolerancia al estrés por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) [Tesis maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. *Biblios-e Archivo*. [eprints.uanl.mx](http://eprints.uanl.mx)

- Darwish, R., Gedi, M. A., Akepach, P., Assaye, H., Zaky, A. S., Y Gray, D. A. (2020). *Chlamydomonas reinhardtii* is a potential food supplement with the capacity to outperform *Chlorella* and *Spirulina*. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(19), 1–17. <https://doi.org/10.3390/app10196736>
- Dufour Etienne, F., Henry, N., and Wolter, R. (1992). Constant pH-multi-enzymatic forecasting methods of the digestibility of proteins in dogs. *Recueil de Medecine Veterinaire (France)*.
- El-Sayed, A. F. M. (1999). Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* *Aquaculture*, 179(1-4), 149-168
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Fanizza, C., Trocino, A., Stejskal, V., Prokešová, M. D., Zare, M., Tran, H. Q., Brambilla, F., Xiccato, G., and Bordignon, F. (2023). Practical low-fishmeal diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in RAS: Effects of protein meals on fish growth, nutrient digestibility, feed physical quality, and faecal particle size. *Aquaculture Reports*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101435>
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- FAO. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Fetahi, T., Rothhaupt, K. O., and Peeters, F. (2018). Dietary map of Nile tilapia using stable isotopes in three tropical lakes, Ethiopia. *Ecology of Freshwater Fish*, 27(1), 460–470. <https://doi.org/10.1111/eff.12361>
- Fırat, Ö., Cogun, H. Y., Yüzereroğlu, T. A., Gök, G., Fırat, Ö., Kargin, F., & Kötemen, Y. (2011). A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 657-666. DOI: 10.1007/s10695-011-9466-3

- Focken, U. (2001). Stable isotopes in animal ecology: The effect of ration size on the trophic shift of C and N isotopes between feed and carcass. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 37(3), 199–211. <https://doi.org/10.1080/10256010108033296>
- Fry, B. (2006). *Stable Isotope Ecology*. Springer Science. NY, USA. 121-134 pp.
- Gamboa-Delgado, J. (2022). Isotopic techniques in aquaculture nutrition: State of the art and future perspectives. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 14, Issue 1, pp. 456–476). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/raq.12609>
- Gamboa-Delgado, J., & Le Vay, L. (2009). Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture*, 291(1-2), 115-123. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.03.012
- Gamboa-Delgado, J., Ibarra, A. G. A., A., Navarro, Y. I. M., Nieto-López, M. G., Villarreal-Cavazos, D., Maldonado-Muñiz, Tapia-Salazar, M., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L. E. (2017). La biomasa microbiana como ingrediente en la nutrición acuícola. *Avances en Nutrición Acuicola*. 213–263.
- Gamboa-Delgado, J., Márquez-Reyes, J. M., y Godínez-Siordia, D. E. (2022). Producción masiva de microorganismos para la obtención de proteína sustentable con alto valor biológico. *CIENCIA ergo-sum*, 30(3). DOI: 10.30878/ces.v30n3a11
- Gamboa-Delgado, J., Nieto-López, M. G., Maldonado-Muñiz, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., and Cruz-Suárez, L. E. (2020). Comparing the assimilation of dietary nitrogen supplied by animal-, plant- and microbial-derived ingredients in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: A stable isotope study. *Aquaculture Reports*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100294>
- Gamboa-Delgado, J., Rojas-Casas, M. G., Nieto-López, M. G., and Cruz-Suárez, L. E. (2013). Simultaneous estimation of the nutritional contribution of fish meal, soy protein isolate and corn gluten to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using dual stable isotope analysis. *Aquaculture*, 380, 33-40. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.11.028



- Gamboa-Delgado, J., and Márquez-Reyes, J. M. (2018). Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture*, 10(1), 224-246. <https://doi.org/10.1111/raq.12157>
- García-Pérez, O. D., Cruz-Valdez, J. C., Ramírez-Martínez, C., Villarreal-Cavazos, D., & Gamboa-Delgado, J. (2018). Exploring the contribution of dietary protein from poultry by-product meal and fish meal to the growth of catfish *Ictalurus punctatus* by means of nitrogen stable isotopes. *Latin american journal of aquatic research*, 46(1), 37-44. <http://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue1-fulltext-5>
- García-Pérez, O. D., Sanchez-Casas, R. M., Moreno-Degollado, G., Munguía, C. A. G., Villarreal-Cavazos, D., and Gamboa-Delgado, J. (2022). Substitution of fish meal with Madagascar cockroach (*Gromphadorhina portentosa*) meal in diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects on growth, nutrient assimilation, and nitrogen turnover rates. *Fish Physiology and Biochemistry*, 48(6), 1587–1597. <https://doi.org/10.1007/s10695-022-01153-6>
- García-Pérez, O. D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M. G., Cruz-Valdez, J. C., Maldonado-Muñiz, M., Guerrero Guerrero, L. M., Cruz-Suárez, L. E., and Marroquín-Cardona, A. G. (2020). Effects of conjugated linoleic acid and curcumin on growth performance and oxidative stress enzymes in juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feed with aflatoxins. *Aquaculture Research*, 51(3), 1051–1060. <https://doi.org/10.1111/are.14451>
- García-Ponce, R. (2020). Evaluación de alternativas fitoterapéuticas y acaricidas sintéticos sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarí: Ixodidae) [Tesis maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. *Biblios-e Archivo*.
- García-Pérez, O. D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M. G., Cruz-Valdez, J. C., Maldonado-Muñiz, M., Guerrero Guerrero, L. M., ... & Marroquín-Cardona, A. G. (2020). Effects of conjugated linoleic acid and curcumin on growth performance and oxidative stress enzymes in juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feed with aflatoxins. *Aquaculture Research*, 51(3), 1051-1060. <https://doi.org/10.1111/are.14451>

- Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Abel, H., and Becker, K. (2004). Individual protein balance strongly influences  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Naturwissenschaften*, 91, 90-93. DOI: 10.1007/s00114-003-0496-2
- Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Abel, H., and Becker, K. (2007). Starvation and low feeding levels result in an enrichment of  $^{13}\text{C}$  in lipids and  $^{15}\text{N}$  in protein of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Journal of Fish Biology*, 71(1), 90–100. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01469.x>
- Gonçalves, A. T., Valenzuela-Muñoz, V., & Gallardo-Escárate, C. (2017). Intestinal transcriptome modulation by functional diets in rainbow trout: A high-throughput sequencing appraisal to highlight GALT immunomodulation. *Fish & shellfish immunology*, 64, 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.022>
- González, C. A., Cruz, J., and Alfaro, R. M. (2015). Physiological response of alligator gar juveniles (*Atractosteus spatula*) exposed to sub-lethal doses of pollutants. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(4), 1015–1027. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0066-5>
- Graü de Marín, C., Marval, H., y Zerpa de Marcano, A. (2007). Utilización de la harina de pescado en la formulación de alimentos para crecimiento y engorde animal. *Elaboración de productos agrícolas*. INIA Divulga, 10.
- Guillin, F. M., Gaudichon, C., Guérin-Deremaux, L., Lefranc-Millot, C., Khodorova, N., Besançon, S., and Calvez, J. (2023). Caecal digestibility as an approximation of ileal protein digestibility evaluation in rats. *Journal of Nutritional Science*, 12. <https://doi.org/10.1017/jns.2023.3>
- Han, J., Won, E. J., Hwang, D. S., Shin, K. H., Lee, Y. S., Leung, K. M. Y., Lee, S. J., y Lee, J. S. (2014). Crude oil exposure results in oxidative stress-mediated dysfunctional development and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus* and modulates expression of cytochrome P450 (CYP) genes. *Aquatic Toxicology*, 152, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.027>
- Hesslein, R. H., Hallard, K. A., & Ramlal, P. (1993). Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a

- change in diet traced by  $\delta^{34}\text{S}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ , and  $\delta^{15}\text{N}$ . *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(10), 2071-2076. DOI: 10.1139/f93-230
- Hirashi, T., Matsumoto, M., Hazaki, K., Sachi, Y., Vi, M., & Seya, T. (2002). Activation of the human innate system by *Spirulina*: Augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int Immunopharmacol*, 2, 423-34.
- Holth, T. F., Eidsvoll, D. P., Farnen, E., Sanders, M. B., Martínez-Gómez, C., Budzinski, H., Burgeot, T., Guilhermino, L., and Hylland, K. (2014). Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 154, 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.013>
- Huang, T. L., Obih, P. O., Jaiswal, R., Hartley, W. R., and Thiyagarajah, A. (1997). Evaluation of Liver and Brain Esterases in the Spotted Gar Fish (*Lepisosteus oculatus*) as Biomarkers of Effect in the Lower Mississippi River Basin. In *Bull. Environ. Contam. Toxicol* (Vol. 58).
- Huang, Z., Gao, J., Peng, C., Song, J., Xie, Z., Jia, J., ... & Gong, B. (2023). The Effect of the Microalgae *Chlorella vulgaris* on the Gut Microbiota of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Is Feeding-Time Dependent. *Microorganisms*, 11(4), 1002
- Hülßen, T., Carvalho, G., Egger, F., Cruz, H., Vertstraete, W., Batstone, D. J., and Pikaar, I. (2019). Production of single-cell proteins from organic matter and residual nitrogen. In *Wastewater Treatment Residues as Resources for Biorefinery Products and Biofuels* (pp. 355–389). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816204-0.00016-3>
- Ibrahem, M. D., & Ibrahim, M. A. (2014). The potential effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on tissue protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through estimation of P53 level. *Journal of advanced research*, 5(1), 133-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.03.009>
- INAPESCA. (2018). *Acuacultura Tilapia*. México. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-tilapia>

- Kari, Z. A., Kabir, M. A., Dawood, M. A., Razab, M. K. A. A., Ariff, N. S. N. A., Sarkar, T., y Wei, L. S. (2022). Effect of fish meal substitution with fermented soy pulp on growth performance, digestive enzyme, amino acid profile, and immune-related gene expression of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 546, 737418.
- Khafaga, A. F., Naiel, M. A. E., Dawood, M. A. O., and Abdel-Latif, H. M. R. (2020). Dietary *Origanum vulgare* essential oil attenuates cypermethrin-induced biochemical changes, oxidative stress, histopathological alterations, apoptosis, and reduces DNA damage in Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 228, 105624. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2020.105624>
- Khalila, H. S., Fayed, W. M., Mansour, A. T., Srour, T. M., Omar, E. A., Darwish, S. I., & Moussa Nour, A. A. (2018). Dietary Supplementation of *Spirulina*, *Arthrospira platensis*, With Plant Protein Sources and their Effects on Growth, Feed Utilization and Histological Changes in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 9(10). <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000549>
- Kirimi, J. G., Musalia, L. M., Magana, A., y Munguti, J. M. (2016). Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed Diets Containing Blood Meal as a Replacement of Fish Meal. *Journal of Agricultural Science*, 8(8), 79. <https://doi.org/10.5539/jas.v8n8p79>
- Klanian, M. G., Díaz, M. D., Solís, M. J. S., Aranda, J., & Moral, P. M. (2020). Effect of the content of microbial proteins and the poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in biofloc on the performance and health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings fed on a protein-restricted diet. *Aquaculture*, 519, 734872. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734872>
- Linnaeus. (1758). *Oreochromis niloticus*. in *Global Names Architecture*. Global Names Usage Bank. <https://doi.org/10.15468/pwn0bl> accessed via GBIF.org on 2023-10-30.
- Liu, C., Liu, H., Xu, W., Han, D., Xie, S., Jin, J., ... & Zhu, X. (2019). Effects of dietary *Arthrospira platensis* supplementation on the growth, pigmentation, and antioxidation in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 510, 267-275. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.067>

- Lu, J., Takeuchi, T., and Satoh, H. (2004). Ingestion and assimilation of three species of freshwater algae by larval tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 238(1–4), 437–449. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.002>
- Luan, Y., Li, M., Zhou, W., Yao, Y., Yang, Y., Zhang, Z., Ringø, E., Erik Olsen, R., Liu Clarke, J., Xie, S., Mai, K., Ran, C., & Zhou, Z. (2023). The Fish Microbiota: Research Progress and Potential Applications. In *Engineering*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.12.011>
- M Al-Zayat, A. (2019). Effect of various levels of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) as feed supplement on growth performance, feed utilization, immune response and hematology of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(3), 361-370.
- Mabrouk, M. M., Ashour, M., Labena, A., Zaki, M. A., Abdelhamid, A. F., Gewaily, M. S., ... & Ayoub, H. F. (2022). Nanoparticles of *Arthrospira platensis* improves growth, antioxidative and immunological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 53(1), 125-135. DOI: 10.1111/are.15558
- MacAvoy S.E, S. E., Macko, S. A., & Arneson, L. S. (2005). Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Canadian Journal of Zoology* 83, 631–641.
- Macias-Sancho, J., Poersch, L. H., Bauer, W., Romano, L. A., Wasielesky, W., and Tesser, M. B. (2014). Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture*, 426–427, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.028>
- Mahmoud, M. M. A., El-Lamie, M. M. M., Kilany, O. E., and Dessouki, A. A. (2018). *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) supplementation improves growth performance, feed utilization, immune response, and relieves oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Pseudomonas fluorescens*. *Fish and Shellfish Immunology*, 72, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.006>

- Martínez-Porcha, M., Garibay-Valdez, E., Vargas-Albores, F., Santa-Cruz, A y Medina-Félix, D. (Junio, 2023). El papel de la microbiota intestinal en la salud de los peces. *Panorama acuícola*, 28 (4). 24-27. [https://issuu.com/designpublications/docs/web\\_panorama\\_acuicola\\_28-4\\_mayo\\_junio\\_2024](https://issuu.com/designpublications/docs/web_panorama_acuicola_28-4_mayo_junio_2024)
- Martinez-Porchas, M., Preciado-Álvarez, A., Vargas-Albores, F., Gracia-Valenzuela, M. H., Cicala, F., Martinez-Cordova, L. R., ... & Garibay-Valdez, E. (2023). Microbiota plasticity in tilapia gut revealed by meta-analysis evaluating the effect of probiotics, prebiotics, and biofloc. *PeerJ*, 11, e16213. DOI: 10.7717/peerj.16213
- Martínez, A. U., López, F. M., Álvarez-González, C. A., y Perales-García, N. (2011). Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. *Avances en Nutrición Acuicola*. No encontrada
- Matassa, S., Boon, N., Pikaar, I., y Verstraete, W. (2016). Microbial protein:future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 568–575. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12369>
- Merrifield, D. L., and Rodiles, A. (2015). The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In *Mucosal health in aquaculture* (pp. 273-295). Academic Press.
- Miles, R. D., and Chapman, F. A. (2007). The concept of ideal protein in formulation of aquaculture feeds: FA144/FA144, 3/2007. *EDIS*, 200 <https://edis.ifas.ufl.edu>
- Miles, R. D., y Chapman, F. A. (2020). The Concept of Ideal Protein in Formulation of Aquaculture Feeds 1. <https://edis.ifas.ufl.edu>
- Molina, R., Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Moyano, R., Monterde, J. G., & Cameán, A. (2005). Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in *Tilapia* fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicon*, 46(7), 725-735.
- Narimbi, Justin, Debashish Mazumder, and Jesmond Sammut. "Stable isotope analysis to quantify contributions of supplementary feed in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (GIFT strain) aquaculture." *Aquaculture research* 49.5 (2018): 1866-1874.

- National Research Council (NRC). (2011). Nutritional Requirements of fish and shrimp .National Academic Press. Washington D.C.
- NICOVITA. (2010). Manual de crianza de Tilapia. NICOVITA, 49 pp. <https://es.slideshare.net/joseleninbazanhuaman/manual-de-crianza-de-tilapia-30212670>
- Nogueira, L., da Silva, D. G. H., Oliveira, T. Y. K., da Rosa, J. M. C., Felício, A. A., and de Almeida, E. A. (2013). Biochemical responses in armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere*, 93(2), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.083>
- Nogueira, L., Sanches, A. L. M., da Silva, D. G. H., Ferrizi, V. C., Moreira, A. B., and de Almeida, E. A. (2011). Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere*, 85(1), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.037>
- OBERON. (2010). Comparison between FAQ fish meal and ProFloc.
- OECD/FAO (2020), OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/a0848ac0-es>.
- Orachunwong, C., S. Thammasart and C. Lohawatanakul. (2001). Recent development in tilapia feeds. In Subasinghe (pp. 113-112).
- Ortega Ascencios, Y. L. (2011). Enfermedades bacterianas de importancia en Tilapia sp (*Oreochromis sp*) de cultivo.
- Øverland, M., Tauson, A. H., Shearer, K., & Skrede, A. (2010). Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals. *Archives of animal nutrition*, 64(3), 171-189. <http://dx.doi.org/10.1080/17450391003691534>
- Pakravan, S., Akbarzadeh, A., Sajjadi, M. M., Hajimoradloo, A., y Noori, F. (2017). Partial and total replacement of fish meal by marine microalga *Spirulina platensis* in the diet of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Growth, digestive enzyme activities, fatty acid composition and responses to ammonia and hypoxia stress. *Aquaculture Research*, 48(11), 5576–5586. <https://doi.org/10.1111/are.13379>

- Pedrotti, F. S., Davies, S., Merrifield, D. L., Marques, M. R. F., Fraga, A. P. M., Mouriño, J. L. P., & Fracalossi, D. M. (2015). The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research*, 46(2), 472–481. <https://doi.org/10.1111/are.12195>
- Pedroza, H., Y Dicovskyi, L. (2007). Sistema de análisis estadísticos con SPSS.
- Phillips, D. L., and Gregg, J. W. (2001). Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia*, 127, 171-179.
- Plaza, I., García, J. L., and Villarroel, M. (2018). Effect of spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and stress responsiveness under hypoxia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1). <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-11698>
- Plaza, I., García, J. L., Galán, B., De la Fuente, J., Bermejo-Poza, R., & Villarroel, M. (2019). Effect of *Arthrospira* supplementation on *Oreochromis niloticus* gut microbiota and flesh quality. *Aquaculture Research*, 50(5), 1448-1458.
- Plaza, I., García, J. L., y Villarroel, M. (2018). Effect of spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and stress responsiveness under hypoxia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1). <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-11698>
- Quintino Rivera, J. G. (2022). Cambios en la tasa de recambio metabólica, actividad digestiva y biota bacteriana en el camarón *Penaeus vannamei* por efecto del crecimiento compensatorio (Master's thesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC). <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/3114>
- Rahman, M. D., Razak, S. A., y Vikineswary, S. (2012). Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Biotechnology*, 11(24). <https://doi.org/10.5897/ajb11.1084>



- Ribalta, C., Sanchez-Hernandez, J. C., & Solé, M. (2015). Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. *Science of the Total Environment*, 532, 176-183.
- Rincón-González, P.E. (2022). Eficacia de mosquicidas y presencia de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp., en poblaciones de *Haematobia irritans* [Tesis maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. *Biblios-e Archivo*.
- Ringø, E. Z. Z. V., Zhou, Z., Vecino, J. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., ... & Merrifield, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?. *Aquaculture nutrition*, 22(2), 219-282
- Santiago, L. S., Silvera, K., Andrade, J. L., y Dawson, T. E. (2005). El uso de isótopos estables en biología tropical. *Interciencia*, 30 (9).
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Sherif, A. H., Al-Sokary, E. T., Rizk, W. F., & Mahfouz, M. E. (2020). Immune status of *Oreochromis niloticus* subjected to long-term lead nitrate exposure and a *Arthrospira platensis* treatment trial. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 76, 103352.
- Silva-Neto, J. F., Nunes, A. J. P., Sabry-Neto, H., y Sá, M. V. C. (2012). Spirulina meal has acted as a strong feeding attractant for *Litopenaeus vannamei* at a very low dietary inclusion level. *Aquaculture Research*, 43(3), 430–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02846.x>
- Simonato, J. D., Guedes, C. L., & Martinez, C. B. (2008). Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 69(1), 112-120.
- Siringi, J. O., Turoop, L., and Njonge, F. (2021). Growth and biochemical response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to spirulina (*Arthrospira platensis*) enhanced

aquaponic system. *Aquaculture*, 544.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737134>

Slawski, H., Gotz, K. P., & Schulz, C. (2010). N-15: an indicator of the assimilation of dietary proteins for *Oreochromis niloticus*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 62(3), 146-154

Soni, R. A., Sudhakar, K., y Rana, R. S. (2017). Spirulina – From growth to nutritional product: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 69, pp. 157–171). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>

Tapia-Salazar, M., García-Pérez, O. D., Nieto-López, M. G., Cruz-Valdez, J. C., Maldonado-Muñiz, M., Cruz-Suárez, L. E., & Marroquín-Cardona, A. G. (2022). Growth parameters and activity of xenobiotic-metabolizing enzymes of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed diets containing aflatoxins and an aflatoxin binder. *Hidrobiológica*, 32(2), 141-148.

Therrien, J. F., Fitzgerald, G., Gauthier, G., & Bêty, J. (2011). Diet–tissue discrimination factors of carbon and nitrogen stable isotopes in blood of Snowy Owl (*Bubo scandiacus*). *Canadian Journal of Zoology*, 89(4), 343-347.

Tonglet, C., Jeusette, I., Istasse, L., and Diez, M. (2001). Prediction of protein digestibility in dog food by a multi-enzymatic method: A useful technique to develop. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85(7–8), 189–194.  
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2001.00334.x>

Torres-Novoa, D. M., y Hurtado-Nery, V. L. (2012). Requerimientos nutricionales para Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Orinoquia*, 16(1), 63-68.

Trushenski, J. (2015). Nutritional impacts on fish mucosa: dietary considerations. In *Mucosal health in aquaculture* (pp. 199-209). Academic Press.

University of Kentucky. (2023). Department of Animal & Food Sciences.  
<https://afs.ca.uky.edu/livestock/judging/livestock-calculations#Weight-Gain>

Urías Sotomayor, R., Maeda Martínez, A. N., Garza Torres, R., García Morales, R., & Navarro Murillo, R. (2022). Análisis de la producción de crías de tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en instalaciones acuícolas en México de 2014-2021.

- AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura., 4(1), 1–6.  
<https://doi.org/10.33936/at.v4i1.4369>
- Uscanga-Martínez, A., Moyano-López, F. J., Álvarez-González, C. A., y Perales-García, N. (2011). Avances en Nutrición Acuícola XI-Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre.
- Vasilaki, A., Mente, E., Fountoulaki, E., Henry, M., Nikoloudaki, C., Berillis, P., ... & Nengas, I. (2023). Fishmeal, plant protein, and fish oil substitution with single-cell ingredients in organic feeds for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Frontiers in Physiology*, 14, 1199497. DOI: 10.3389/fphys.2023.1199497
- Vázquez-Vera, L. y Chávez-Carreño, P. (2022). Diagnóstico de la acuicultura en México. ISBN: 978-607-99061-5-3 Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza, A.C. México.
- Velasquez, S. F., Chan, M. A., Abisado, R. G., Traifalgar, R. F. M., Tayamen, M. M., Maliwat, G. C. F., and Ragaza, J. A. (2016). Dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1023–1030. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0661-y>
- Vonshak, A. (2002). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*.
- Wen, J. (2018). Effect of amino acids and vitamin D3 on performance and biological responses in poultry (Doctoral dissertation, Virginia Tech).
- Wilce, M. C., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1), 1-18. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90086-8)
- Wing-Keong, N., y Romano, N. (2013). A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 5, Issue 4, pp. 220–254). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12014>

- Wu, Z., Wang, S., Zhang, Q., Hao, J., Lin, Y., Zhang, J., and Li, A. (2020). Assessing the intestinal bacterial community of farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by high-throughput absolute abundance quantification. *Aquaculture*, 529, 735688.
- Wu, Z., Zhang, Q., Lin, Y., Hao, J., Wang, S., Zhang, J., & Li, A. (2021). Taxonomic and functional characteristics of the gill and gastrointestinal microbiota and its correlation with intestinal metabolites in NEW GIFT strain of farmed adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Microorganisms*, 9(3), 617.
- Xia, Y., Liu, C., Fei, S., Liu, H., Han, D., Jin, J., ... & Xie, S. (2021). *Arthrospira platensis* additive enhances the growth performance and antioxidant response in hybrid yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*♀ × *Pelteobagrus vachelli*♂). *Aquaculture Reports*, 20, 100721. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100721>
- Xu, B., Liu, Y., Chen, K., Wang, L., Sagada, G., Tegomo, A. F., Yang, Y., Sun, Y., Zheng, L., Ullah, S., & Shao, Q. (2021). Evaluation of Methanotroph (*Methylococcus capsulatus*, Bath) Bacteria Meal (FeedKind®) as an Alternative Protein Source for Juvenile Black Sea Bream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.778301>
- Yossa, R., Greiling, A. M., Basiita, R. K., Sakala, M. E., Baumgartner, W. A., Taylor, A., and Gatlin, D. M. (2021). Replacing fishmeal with a single cell protein feedstuff in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* diets. *Animal Feed Science and Technology*, 281. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115089>
- Zeng, X. N., Zhang, X. Y., Chen, B., Gao, L. L., Liu, S., Wu, F., & Pan, Q. (2021). Dietary four different woody forages differentially affect the growth, feed utilization, apparent digestibility, intestinal morphology and microbiota composition in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports*, 21, 100786. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100786>
- Zheng, Y., Hu, G., Wu, W., Qiu, L., Bing, X., & Chen, J. (2020). Time-dependent gut microbiota analysis of juvenile *Oreochromis niloticus* by dietary supplementation of resveratrol. *Archives of Microbiology*, 202, 43-53.

Zhou, H., and Gu, B. (2020). Using stable isotope analysis to assess the relationship among dietary protein sources, growth, nutrient turnover and incorporation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 26(5), 1443-1452.

Zhou, Z., Ringø, E., Olsen, R. E., & Song, S. K. (2018). Dietary effects of soybean products on gut microbiota and immunity of aquatic animals: A review. In *Aquaculture Nutrition* (Vol. 24, Issue 1, pp. 644–665). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/anu.12532>