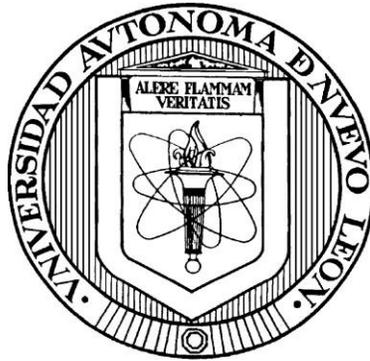


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“Efecto de una biomasa bacteriana como sustituto de harina de  
pescado, sobre parámetros de rendimiento, asimilación de nutrientes y  
biomarcadores enzimáticos de estrés en la tilapia del Nilo (*Oreochromis  
niloticus*)”**

**POR**

MVZ Enrique Moar Gómez

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**Diciembre de 2024**

**“Efecto de una biomasa bacteriana como sustituto de harina de pescado, sobre parámetros de rendimiento, asimilación de nutrientes y biomarcadores enzimáticos de estrés en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)”**

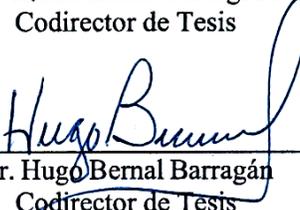
Aprobación de Tesis por el comité particular de

MVZ Enrique Moar Gómez

**COMITÉ DE TESIS**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Oscar Daniel García Pérez  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Julián Gamboa Delgado  
Codirector de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Hugo Bernal Barragán  
Codirector de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. David Villarreal Cavazos  
Codirector de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Julio César Cruz Valdez  
Codirector de Tesis

**“Efecto de una biomasa bacteriana como sustituto de harina de pescado, sobre parámetros de rendimiento, asimilación de nutrientes y biomarcadores enzimáticos de estrés en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)”**

Aprobación de tesis por el comité particular de

Enrique Moar Gómez

**COMITÉ DE TESIS**



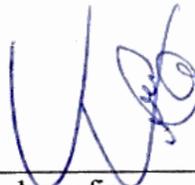
---

Nombre y firma  
Dr. Oscar Daniel García Pérez  
Director de Tesis



---

Nombre y firma  
Dr. Julián Gamboa Delgado  
Codirector Externo



---

Nombre y firma  
Dr. Uziel Castillo Velázquez  
Subdirector de Posgrado e Investigación

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis padres por proporcionarme siempre las herramientas necesarias para salir adelante, por sus sacrificios, su tiempo y por ser una guía constante de esfuerzo y trabajo duro. Sin su inquebrantable apoyo, nada de esto sería posible.

A mi director de tesis doctor Oscar García, por confiar en mí y ofrecerme su apoyo incondicional al trabajar con él y su equipo por brindarme el conocimiento fundamentales para mi crecimiento académico y profesional.

Al doctor Hugo Bernal, por su paciencia y por no rendirse conmigo en los momentos en que más necesité orientación. Su constante esfuerzo me ha impulsado a seguir esforzándome y superarme cada día.

Al doctor Julián Gamboa, por su valiosa orientación en las técnicas isotópicas y por dedicar su tiempo a mi continuo aprendizaje. Su sabiduría y generosidad han sido una inspiración para siempre haciendo e trabajo con actitud de agradecimiento.

Al doctor Julio Cruz, por su orientación en las prácticas de seguridad y calidad de vida de los animales. Su compromiso ha enriquecido enormemente mi formación en la ética.

Al doctor David Villareal, por su detallada orientación en los procesos de manufactura de alimentos. Agradezco profundamente su orientación y conocimientos, los cuales han sido fundamentales en mi crecimiento dentro de esta área. Su apoyo durante el bioensayo, ha sido esencial para alcanzar mis metas.

A la doctora Nydia y al personal del laboratorio de Nutrición de Agronomía, por brindarme su apoyo incondicional durante los dos años de maestría. Su ayuda y colaboración han sido vitales en este viaje.

A todos los docentes que formaron parte de este camino, por ofrecerme la oportunidad de aprender de ellos y permitirme desarrollarme profesionalmente. Cada uno de ustedes ha contribuido de manera significativa a mi vida, dejando recuerdos y enseñanzas que siempre llevaré conmigo.

Dra. Rosa María Sánchez, gracias por estar en mi camino de formación como médico veterinario, desde la licenciatura. Le agradezco profundamente su amistad incondicional, su apoyo en los momentos difíciles y su constante acompañamiento, que me han ayudado a enfrentar los retos de esta etapa con fortaleza y confianza.

A la maestra Jocelyn López, Julia Arteaga y la Dra. Daniela, gracias por todo su apoyo

incondicional. Me hicieron sentir siempre bienvenido en todo este proceso y me hicieron parte del equipo de nutrición. Estaré eternamente agradecido con ambas por su amistad, comprensión y por brindarme un espacio donde pude crecer y aprender. Su apoyo ha sido fundamental en mi formación.

A la Dra. Yareellys Ramos Zaya, gracias por ser mi tutora y por acompañarme en mi formación como maestro en Ciencias Animal. Su orientación, comprensión y el tiempo que me brindó fueron fundamentales en este camino que recorrí. Siempre estaré agradecido por su apoyo y dedicación.

A la Dra. Sibilina y al Dr. Uziel, Gracias por su orientación y coordinación en este proceso. Me enseñaron las bases correctas para formarme en este proceso de maestría y me brindaron oportunidades a lo largo de este camino. Su apoyo ha sido fundamental para mi desarrollo académico y profesional. Estaré siempre agradecido por su tiempo y dedicación.

Gracias a Mayra por brindarme su amistad incondicional y su apoyo a lo largo de este proceso de cambio que comenzó desde el inicio de mis estudios y hasta el final. Gracias por ser una gran persona y por estar siempre a mi lado. Tu presencia ha sido fundamental en mi camino, y siempre estaré agradecido por todo lo que has hecho por mí.

Gracias a todas las personas que formaron parte del bioensayo y me brindaron su apoyo incondicional. Siempre estaré agradecido por todo el respaldo recibido a lo largo de esta etapa tan importante en mi investigación. Mi reconocimiento a Isac Lozano, Nataly Peña, al Dr. Carlos Ramírez, al Médico Sergio y a todo el equipo del laboratorio de Producción Acuícola. Sin su ayuda, parte del proyecto no habría sido posible.

A la Dra. Magda Berenice Gómez Guajardo (CLOVE), gracias por apoyarme en las etapas de crecimiento como profesional veterinaria. Su dedicación y ejemplo de sacrificio son vitales para formarme en esta profesión. Su apoyo incondicional en momentos difíciles ha sido una inspiración, mostrándome lo que significa ser una médica comprometida con vocación.

Al programa SECIHTI (antes CONAHCYT), por su apoyo económico, permitiéndome continuar con mi investigación y hacer realidad este sueño.

## DEDICATORIA

Siempre estaré agradecido con todas las personas que estuvieron me acompañaron en este camino. Al sumergirme en este viaje, comprendí que Dios, en su infinita sabiduría, nos moldea para darnos la fortaleza necesaria para alcanzar nuestras metas y logros sin rendirnos jamás. Dedico esta tesis a mis padres, Antonio Moar Gómez y María Magdalena Gómez Escobedo, por creer en mí cuando nadie más lo hizo, por darme fuerzas cuando sentía que no podía y por sostenerme cuando caía Sin ustedes, no habría encontrado la fuerza para seguir adelante, ni para cumplir esta etapa de mi vida. Es difícil encontrar palabras que reflejen plenamente el cariño y la profunda gratitud que les tengo. Agradezco profundamente el apoyo de mis hermanos, Arturo y Antonio Moar Gómez. Sé que no siempre fui el mejor hermano, pero a pesar de mis errores, ellos nunca dejaron de estar ahí para mí. Estaré eternamente agradecido, porque, a su manera, siempre me expresaron su amor y me recordaron el valor de la familia.

A mi director de tesis y a todos los maestros que formaron parte de este camino, gracias por ayudarme a descubrir habilidades que no sabía que tenía. Gracias por mostrarme las capacidades que se esconden dentro de mí, por su paciencia, comprensión y dedicación. Por ser grandes maestros de vida. Gracias al personal docente como ustedes, que motiva e inspira, el mundo avanza y cambia vidas.

Agradezco al programa de posgrado y a todo su equipo por haberme permitido formar parte de este proceso. Su respaldo ha sido clave en mi desarrollo profesional y en el logro de mis objetivos.

Finalmente, agradezco a SECIHTI por su apoyo económico, permitiéndome continuar con mi investigación y hacer realidad este sueño.

Doy gracias a Dios por guiarme en este camino y por bendecirme con personas tan maravillosas que me han apoyado en cada paso.

# ÍNDICE

## Tabla de contenido

|   |      |
|---|------|
| <i>AGRADECIMIENTOS</i> .....  | iv   |
| <i>DEDICATORIA</i> .....  | vi   |
| <i>ÍNDICE</i> .....   | vii  |
| <i>ÍNDICE DE FIGURAS</i> .....  | ix   |
| <i>ÍNDICE DE TABLAS</i> .....   | xiii |
| <i>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA</i> .....                                    | xiv  |
| <i>RESUMEN</i> .....  | xvii |
| <b>1. INTRODUCCION</b> .....  | 1    |
| <b>2. ANTECEDENTES</b> .....  | 3    |
| 2.1 ACUACULTURA .....   | 3    |
| 2.2 TILAPIA DEL NILO ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....                     | 5    |
| 2.2.1 TAXONOMÍA .....   | 5    |
| 2.2.2 CICLO DE VIDA .....   | 6    |
| 2.2.3 PRODUCCIÓN DE TILAPIA EN EL MUNDO .....                                   | 7    |
| 2.2.4 TILAPIA DEL NILO EN MÉXICO .....  | 8    |
| 2.2.5 SISTEMAS DE CULTIVO .....   | 9    |
| 2.3 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES .....  | 11   |
| 2.4 PRODUCCIÓN HARINA DE PESCADO .....  | 13   |
| 2.5 ALTERNATIVAS DE HARINA DE PESCADO .....                                     | 14   |
| 2.6 BIOMASA BACTERIANA .....  | 16   |
| 2.7 DIGESTIBILIDAD Y ASIMILACIÓN DE ALIMENTOS .....                             | 18   |
| 2.7.1 ANÁLISIS ISOTÓPICO .....  | 19   |
| 2.8 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS EN HÍGADO .....                     | 21   |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....                      | 23   |
| <b>4. HIPÓTESIS</b> .....   | 24   |
| <b>5. OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN</b> .....                         | 24   |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL .....  | 24   |
| 5.1.1 <i>Objetivos específicos</i> .....  | 24   |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 25   |
| 6.1 INSTALACIONES DE ELABORACIÓN DE DIETAS Y BIOENSAYO .....                    | 25   |
| 6.2 DIETAS EXPERIMENTALES .....   | 26   |
| 6.3 ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS .....   | 28   |
| 6.3.1 <i>MATERIA SECA (MÉTODO 967.03, AOAC)</i> .....                           | 28   |
| 6.3.2 <i>GRASA (MÉTODO AM 5-04, AOCS)</i> .....                                 | 29   |
| 6.3.3 <i>CENIZA (MÉTODO 942.05, AOAC)</i> .....                                 | 30   |
| 6.3.4 <i>ENERGÍA</i> .....  | 32   |
| 6.3.5 <i>FIBRA (MÉTODO AM 6-05, AOCS)</i> .....                                 | 33   |
| 6.3.6 <i>PROTEÍNA</i> .....   | 35   |
| 6.4 DISEÑOS EXPERIMENTALES .....  | 37   |
| 6.4.1 <i>BIOENSAYO E INSTALACIONES</i> .....                                    | 37   |
| 6.4.2 <i>UNIDADES EXPERIMENTALES</i> .....                                      | 39   |
| 6.4.3 <i>ALIMENTACIÓN</i> .....   | 40   |
| 6.5 PARAMETROS DE RENDIMIENTO .....   | 41   |
| 6.6 ANÁLISIS DE ISOTOPOS ESTABLES .....   | 42   |
| 6.6.1 <i>DETERMINACIÓN DE LAS APORTACIONES NUTRICIONALES AL CRECIMIENTO</i> ... | 43   |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.6.2 DURACIÓN PROMEDIO DE RESIDENCIA ELEMENTAL EN LOS TEJIDOS E ÍNDICE DE<br>RECAMBIO DE NUTRIENTES.....              | 45        |
| 6.7 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS.....   | 45        |
| 6.7.1 EXTRACCIÓN DE MUESTRA HEPÁTICA.....  | 45        |
| 6.7.2 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS EN MUESTRAS HEPÁTICAS...   | 47        |
| 6.7.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CARBOXILESTERASA, FOSFATASA<br>ALCALINA Y GLUTATIÓN S-TRANSFERASA..... | 47        |
| 6.7.4 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.....   | 49        |
| 6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 49        |
| <b>7. RESULTADOS</b> .....   | <b>50</b> |
| 7.1 DIETAS EXPERIMENTALES .....  | 50        |
| 7.2 ANÁLISIS DE RENDIMIENTO Y DESARROLLO DE LA TILAPIA .....   | 50        |
| 7.3 CAMBIOS ISOTOPICOS EN EL BIOENSAYO Y FACTORES DE DISCRIMINACIÓN<br>.....   | 53        |
| 7.4 DIETAS EXPERIMENTALES Y SUS APORTES DE CARBONO Y NITRÓGENO EN<br>TEJIDO MUSCULAR .....                             | 55        |
| 7.5 TIEMPOS DE RESIDENCIA EN TEJIDO MUSCULAR (NITROGENO Y CARBONO<br>.....   | 57        |
| 7.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA DE LA ENZIMA ALP .....   | 58        |
| 7.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA DE LA ENZIMA CAE .....   | 60        |
| 7.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA DE LA ENZIMA GST.....  | 62        |
| <b>8. DISCUSIÓN</b> .....  | <b>64</b> |
| <b>9. CONCLUSIONES</b> .....   | <b>80</b> |
| <b>10. PERSPECTIVA</b> .....   | <b>82</b> |
| <b>11. REFERENCIAS</b> .....   | <b>83</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Ilustración gráfica de la FAO (2024) que muestra una comparación de los últimos años entre la pesca de captura y la acuicultura, expresada en millones de toneladas equivalentes de peso vivo .....   | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Ilustración gráfica de los principales productores de la industria pesquera en aguas continentales, con valores representados en millones de toneladas (datos de la FAO, 2022), con una ilustración de la CONABIO (2020) mostrando las regiones hidrológicas prioritarias en México. ....   | 4  |
| <b>Figura 3.</b> Etapas del ciclo de cultivo de <i>Oreochromis niloticus</i> (reproductiva, cría y crecimiento) hasta la etapa de cosecha (sacrificio). Se muestran las fases reproductiva, huevo, larva, postlarva, alevín, juvenil y adulta, según Pedrazzani et al. (2023).....   | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Ilustración gráfica de la producción anual de tilapia representada en miles de toneladas (CONAPESCA (2018)).....  | 9  |
| <b>Figura 5.</b> Ilustración gráfica que muestra la diferencia en la densidad poblacional entre un sistema extensivo (a) y un sistema intensivo (b).....   | 10 |
| <b>Figura 6.</b> Ilustración comparativa sobre los requerimientos nutricionales de la tilapia en etapa juvenil (a), haciendo énfasis en las necesidades de aminoácidos esenciales (b), con referencia al NRC (2011) y al trabajo de Niyibizi (2023). Los requerimientos de aminoácidos esenciales están expresados en gramos de aminoácido por cada 16 gramos de nitrógeno ( $\text{g } 16 \text{ g}^{-1} \text{ N}$ ). .... | 12 |
| <b>Figura 7.</b> Producción global de harina y aceite de pescado de 1976 a 2020. Datos proporcionados por la IFFO y Newton <i>et al.</i> (2022).....   | 14 |
| <b>Figura 8.</b> Proceso industrial de producción de biomasa bacteriana, en el que se detalla desde la fermentación con agua y partículas de oxígeno, nitrógeno y metano, hasta la separación de la humedad. Posteriormente, la biomasa se seca completamente y se almacena (Fuete: Empresa Calysta).....  | 17 |
| <b>Figura 9.</b> Ilustración de los dos ingredientes proteicos utilizados en el experimento: la harina de pescado (a) y la biomasa bacteriana (b) .....  | 25 |
| <b>Figura 10.</b> Ilustración general del proceso de manufactura de las dietas experimental para   |    |

|   |    |
|---|----|
| <i>O. niloticus</i> en presentación de pellet, tamizado de harina (a), pesaje individual (b), mezcla de ingredientes(c), obtención del pellet por el molino Torrey (d), alimento en la estufa de aire forzado (e), alimento envasado (f). .....   | 26 |
| <b>Figura 11.</b> Pesaje de muestras (a), muestras colocadas en la estufa de aire forzada (b)....   | 28 |
| <b>Figura 12.</b> Proceso realizado para la obtención de la grasa total de las dietas experimentales: pesaje de las muestras (a), primer secado en la estufa (b), colocación de las muestras en el extractor de grasa (c), adición de la solución de éter de petróleo (d), retiro de las muestras y colado en la estufa por segunda vez (e), y, finalmente, pesaje de las muestras secas por segunda vez (f). .....   | 30 |
| <b>Figura 13.</b> Pesaje de los crisoles y las muestras (a), muestras en el desecador (b), muestras en el horno (c), muestras colocadas en el desecador (d), se registró de peso de las cenizas (e). .....  | 31 |
| <b>Figura 14.</b> Muestras pesadas y en capsuladas (a), muestra con alambre de combustión (b), muestras colocadas en la bomba de inducción saturada con oxígeno (c), muestras en la bomba calorimétrica (d), monitoreo de la temperatura para llevar a cabo la combustión de la muestra (e), se retira el residuo del alambre de combustión y se mide en centímetros (f). .....   | 32 |
| <b>Figura 15.</b> Ilustraciones del proceso de análisis de fibra para ambos métodos NDF y ADF, pesaje de las muestras en bolsas F57 (a), colocación de las muestras en la estufa (b), muestras en el separador (c), colocación en un analizador de fibra (d), monitoreo y adición de las soluciones correspondientes al proceso (e), segundo pesaje, posterior al secado en la estufa forzada (f). .....  | 34 |
| <b>Figura 16.</b> Ilustración general del método de Kjeldahl, pesaje de la muestra, envuelta en papel (a), colocación de la muestra en el tubo Kjeldahl junto con sulfato de cobre y ácido sulfúrico (b), tubos colocados en el bloque digestor (c), cambio de coloración en las muestras tras 3 horas a 375°C (d), cambio de la muestra a matraces bola con reactivos para aforar y preparación de reactivos en matraces Erlenmeyer con solución rosa (e), colocación de ambos tipos de matraces en el equipo Kjeldahl (f), espera del proceso de destilación dentro del Erlenmeyer con solución verde (g), proceso de titulación utilizando probeta y ácido clorhídrico para determinar la concentración final (h). ..... | 36 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 17.</b> Instalaciones utilizadas durante los 30 días del bioensayo. ....  | 38 |
| <b>Figura 18.</b> Material filtrante y equipo utilizado en los acuarios: canutillos, roca volcánica, bio-esferas y piedras difusoras (a); medidores de amoníaco y productos químicos como anticloro (b); y bomba para la circulación y oxigenación del agua en el acuario (c).....  | 38 |
| <b>Figura 19.</b> Arribo de los peces (aclimatación en los acuarios) (a), inicio del periodo de cuarentena (b), monitoreo de la calidad del agua (c), comienzo de la alimentación con alimento comercial (d). ....  | 39 |
| <b>Figura 20.</b> Retiro del exceso de agua en los peces con toallas húmedas (a), primer pesaje (histograma) (b), distribución de los peces en los acuarios (c), inicio del experimento con 18 peces por acuario (d), ajuste diario de la cantidad de alimento por acuario y recolección de los residuos de alimento (f). ....  | 40 |
| <b>Figura 21.</b> Monitoreo constante del peso de los peces durante el bioensayo.....   | 41 |
| <b>Figura 22.</b> Selección de los peces (a), eutanasia mediante shock térmico (b), registro individual del pez, encapsulado y almacenado en el congelador (c), recolección y clasificación de las muestras (d), secado de los peces en la estufa durante 24 horas a 60°C (e), homogenización de las muestras utilizando un mortero (f), pesaje de las muestras en cápsulas de estaño (g), registro de cada muestra en una caja de Petri para su posterior envío para el análisis elemental e isotópico (h). .... | 42 |
| <b>Figura 23.</b> Jeringas preparadas con ambos tratamientos, diésel y aceite (a), aplicación de los tratamientos vía peritoneal (b), recolección de hígado a las 24 y 48 horas (c), homogenización de las muestras utilizando un mortero (d), centrifugación de las muestras para obtener el paquete enzimático (e), almacenamiento de las muestras en un ultra congelador (f).....  | 46 |
| <b>Figura 24.</b> Lector de microplacas espectrofotométrico (a), microplaca con extracto enzimático y el sustrato correspondiente, y microplaca con BSA para la medición de concentración proteica (c) .....  | 48 |
| <b>Figura 25.</b> Valores de isótopos estables de carbono y nitrógeno (‰) en el músculo de tilapias que recibieron dietas experimentales basadas en harina de pescado (HP) con una sustitución de biomasa bacteriana (BB). Las curvas con comportamiento exponencial representan los promedios obtenidos del análisis de isótopos estables  |    |

|   |    |
|---|----|
| en músculo durante los diversos días de muestreo, y las líneas horizontales señalan los valores isotópicos asociados a los insumos utilizados .....   | 54 |
| <b>Figura 26.</b> Actividad promedio de ALP en muestras hepáticas tras 24 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). ..... | 58 |
| <b>Figura 27.</b> Actividad promedio de ALP en muestras hepáticas tras 48 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). ..... | 59 |
| <b>Figura 28.</b> Actividad promedio de CAE en muestras hepáticas tras 24 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). ..... | 60 |
| <b>Figura 29</b> Actividad promedio de CAE en muestras hepáticas tras 48 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). .....  | 61 |
| <b>Figura 30</b> Actividad promedio de GST en muestras hepáticas tras 24 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). .....  | 62 |
| <b>Figura 31</b> Actividad promedio de GST en muestras hepáticas tras 48 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ). .....  | 63 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Evaluación bromatológica de los ingredientes empleados en la formulación de las dietas experimentales.....   | 25 |
| <b>Tabla 2.</b> Formulación de las cinco dietas experimentales para cría de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> (g/kg de dieta), empleada para el estudio de parámetros de rendimiento, crecimiento, función hepatoprotectora y la asimilación nutricional. ....                                | 27 |
| <b>Tabla 3.</b> Cálculos de los parámetros zootécnicos en animales de producción .....   | 41 |
| <b>Tabla 4.</b> Evaluación de la composición nutricional de las cinco dietas experimentales diseñadas para determinar su contribución del nitrógeno dietario de la harina de pescado (HP) y de la biomasa bacteriana (BB). ....  | 50 |
| <b>Tabla 5.</b> Parámetros de rendimiento en la <i>O.niloticus</i> , del día 0 a los 15 días de bioensayo .....  | 51 |
| <b>Tabla 6.</b> Parámetros de rendimiento en la <i>O.niloticus</i> , a los 30 días de bioensayo.....   | 53 |
| <b>Tabla 7.</b> Asimilación proporcional de nitrógeno en músculo de tilapia alimentada con las dietas con diferentes proporciones de harina de pescado y biomasa bacteriana.....   | 56 |
| <b>Tabla 8.</b> Asimilación proporcional de carbono en músculo de tilapia alimentada con las dietas con diferentes proporciones de harina de pescado y biomasa bacteriana.....   | 56 |
| <b>Tabla 9.</b> Tasas de crecimiento ( $k$ ), tasa de recambio metabólico ( $m$ ) y tiempos medios de residencia ( $t_{50}$ ) de N y C en el tejido muscular de la <i>O. niloticus</i> , alimentadas con diferentes dietas formuladas con harina de pescado (HP) y biomasa bacteriana (BB) ..... | 57 |

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA

| SÍMBOLO O<br>ABREVIATURA | DESCRIPCIÓN |
|--------------------------|-------------|
|--------------------------|-------------|

|          |  |
|----------|--|
| %        | Partes por mil                                     |
| ALP      | Fosfatasa alcalina                                 |
| BB       | Biomasa bacteriana                                 |
| C        | Carbono  |
| CA       | Conversión<br>alimenticia                          |
| CE       | Carboxilesterasa                                   |
| EM       | Energía<br>metabolizable                           |
| FA       | Facultad de<br>Agronomía                           |
| FMVZ     | Facultad de Medicina<br>Veterinaria Y<br>Zootecnia |
| g        | Gramos   |
| GST      | Glutación S-<br>Transferasa                        |
| HP       | Harina de pescado                                  |
| IFFO     | Organización de<br>ingredientes marinos            |
| Inv      | Individual   |
| Kg       | Kilogramos   |
| L        | Litros   |
| <i>m</i> | Recambio metabólico                                |
| mg/L     | Miligramos / Litros                                |
| Min      | Minutos  |
| ml       | Mililitro  |
| Mm       | Milímetro  |
| Mt       | Millones de toneladas                              |

|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| N                | Nitrógeno                           |
| NRC              | Consejo Nacional de Investigaciones |
| Ppm              | Parte por millón                    |
| Rpm              | Revoluciones por minuto             |
| S                | Supervivencia                       |
| SIA              | Análisis de isótopos estables       |
| t                | Toneladas                           |
| TC               | Ganancia porcentual de peso         |
| $\Delta$         | Delta en mayúscula                  |
| $\delta$         | Delta en minúscula                  |
| $\mu\text{l/kg}$ | Microlitro/kilogramo                |
| UANL             | Universidad Autónoma de Nuevo León  |
| NDF              | Fibra detergente neutra             |
| ADF              | Fibra detergente ácida              |
| BSA              | Albúmina de suero bovino            |

## RESUMEN

El uso de bacterias en formulaciones dietéticas para especies acuáticas podría considerarse como un cambio favorable para las granjas acuícolas, tanto en México como a nivel global. El uso de ingredientes microbianos como fuentes proteicas no solo llevaría a un aumento en los parámetros de rendimiento y productivos, sino que también abre la posibilidad de producir alimentos con un alto valor nutricional para el consumidor. Considerando la necesidad de ingredientes alternativos como fuentes de alimentación, surge la pregunta acerca de la posibilidad de obtener beneficios a partir de diversos ingredientes microbianos. Para el organismo consumidor, pueden promoverse efectos positivos, tales como una mejor absorción de nutrientes o posibles efectos antioxidantes y hepatoprotectores. Debido a esta incógnita, se han llevado a cabo varios estudios cuyo objetivo es confirmar una mayor asimilación nutricional, asegurando así el cumplimiento de los parámetros de crecimiento establecidos para los organismos de las granjas acuícolas, específicamente la especie tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). En esta investigación sobre el crecimiento de crías de tilapia del Nilo, se diseñaron 5 dietas experimentales, las cuales fueron administradas a un total de 360 especímenes (con un peso de  $0.5 \pm 0.02$  g) distribuidos en 20 acuarios de 120 litros. Estas dietas fueron diseñadas de manera que se sustituyera gradualmente una harina de pescado (HP) comercial (proteína del 68% y lípidos del 10%) por una biomasa bacteriana (BB) comercial (FeedKind®, con 70% de proteína y 8% de lípidos), manteniendo niveles isoproteicos e isoenergéticos. Con la finalidad de comprobar la asimilación nutricional, se emplearon mediciones isotópicas del carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y el nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en ingredientes y en los peces, para evaluar la contribución de nutrientes en los organismos, junto con la valoración de indicadores de rendimiento, como conversión alimenticia, supervivencia y la ganancia de peso con su respectiva tasa de crecimiento. Simultáneamente, se evaluaron los niveles de estrés hepático tras la exposición a una dosis de diésel  $20 \mu\text{l/kg}$ . Para ello, se tomaron muestras de hígado y se midió el estrés la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, carboxilesterasa y glutatión S-transferasas. Se observaron efectos beneficiosos en la respuesta enzimática, además de favorecer una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes, promovida por las dietas con la inclusión de la harina microbiana.

# 1. INTRODUCCION

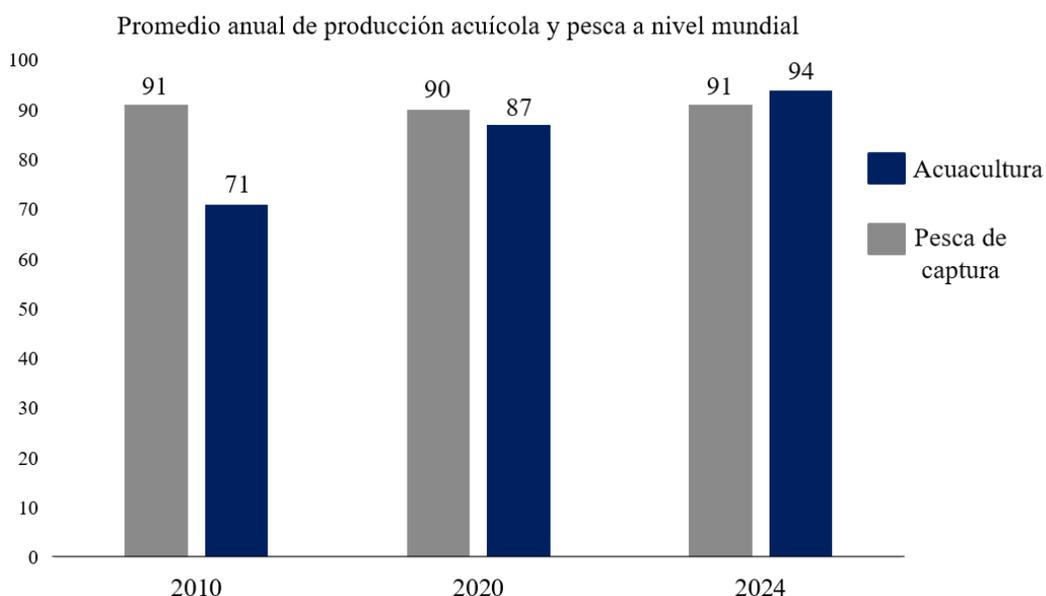
La acuicultura ha adquirido una importancia relevante en la industria alimentaria al ofrecer productos con alto valor nutricional, alta productividad y bajos impactos ambientales. En 2020, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) registró 177.8 millones de toneladas (Mt) de producción acuícola a nivel mundial, de las cuales 157.4 Mt fueron destinadas al consumo humano. Se proyecta un crecimiento del 40 % en la producción acuícola global para 2030, con un aumento sostenible del 25 % el consumo de alimentos provenientes del medio acuático para el 2050. México es uno de los principales productores acuícolas, con una producción registrada de más de 55,000 toneladas (t) anuales, dentro de las cuales la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) se encuentra entre las especies de mayor producción. A nivel mundial, esta especie alcanzó una producción de 4,407 t en 2020 (Vázquez & Chávez, 2022; FAO, 2022). La preferencia de los acuicultores por esta especie se debe a su adaptabilidad, resistencia, eficiencia en la conversión alimenticia (CA) y un favorable aumento de peso (Daudpota *et al.*, 2016). Una alimentación adecuada garantiza un crecimiento y estado nutricional óptimos, fortaleciendo las funciones hepáticas, la capacidad defensiva y la resistencia al ambiente (Kuebutornye *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2021). Algunos de los ingredientes comúnmente utilizados en la manufactura de dietas, son la HP (derivada de sardina), como fuente proteica, y el aceite de pescado como aporte energético (Alder *et al.*, 2008; Shannon & Waller, 2021). El uso de la HP es favorecido debido a su aporte de aminoácidos, composición de ácidos grasos, palatabilidad y fácil digestión (Han *et al.*, 2016). A pesar de los beneficios de la HP, el sector acuícola enfrenta críticas por el uso excesivo de recursos biológicos, especialmente por la dependencia de la HP, cuya producción contribuye a la sobreexplotación de peces silvestres (Cao *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016), lo que conlleva una búsqueda de ingredientes alternativos provenientes de fuentes naturales y renovables (Albrektsen *et al.*, 2022), para disminuir el consumo de la HP, favoreciendo así la sostenibilidad de los ecosistemas marinos (Shannon & Waller, 2021). Una innovadora opción de ingredientes sustitutos son las proteínas unicelulares o BB derivadas de microorganismos, los cuales se caracterizan por su rápido crecimiento y adaptabilidad a diversos medios de cultivo (Gamboa-Delgado *et al.*, 2020).

Aunque existen pocas investigaciones que han demostrado que algunas biomazas bacterianas son opciones nutricionales adecuadas para reemplazar la HP (Gamboa-Delgado & Márquez-Reyes, 2018), es importante seguir evaluando la capacidad nutricional de estos ingredientes, dada la necesidad de reducir los costos de producción acuícola. Por consiguiente, se necesitan más investigaciones para evaluar la calidad nutritiva de estas alternativas (Sorensen, 2012), que abarcan desde análisis bromatológicos utilizando técnicas oficiales (AOAC, 2005), hasta investigaciones relacionadas al desempeño fisiológico, por ejemplo, la estimación de absorción y asimilación, análisis de indicadores de desempeño, exploración de la histología intestinal o hepática, actividad enzimática y parámetros bioquímicos de antioxidantes en suero (Xu *et al.*, 2021). Entre las técnicas empleadas para evaluar la absorción y asimilación de nutrientes, el análisis de isótopos estables (SIA, Stable Isotope Analysis, por sus siglas en inglés) destaca como una herramienta analítica que permite estudiar la asimilación de nutrientes, brindando una visión más precisa y completa sobre su aprovechamiento en las dietas (Gamboa -Delgado, 2022). García-Pérez *et al.* (2022) emplearon los SIA para evaluar el potencial nutricional de una BB y la HP (sardina), utilizando muestras de tejido muscular de tilapias alimentadas previamente con dietas experimentales. Se midieron los valores isotópicos del  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en ingredientes y músculo, con el objetivo de estimar los tiempos requeridos para alcanzar el equilibrio isotópico y cuantificar la retención proporcional del N y C dietarios. Estudios realizados en la tilapia del Nilo han demostrado que, ante la presencia de un contaminante, se incrementará la incidencia de problemas de salud y los cambios hematobioquímicos (Hasan *et al.*, 2022; Gao *et al.*, 2023). Al concluir el bioensayo, 10 peces por tratamiento fueron expuestos a una dosis no letal de diésel mediante inyección intraperitoneal, con el fin de evaluar su respuesta ante contaminantes. Posteriormente, en muestras de hígado de los peces se midió la actividad de enzimas biomarcadoras de estrés hepático, las enzimas evaluadas fueron glutatión S-transferasa (GST), carboxilesterasa (CAE) y la fosfatasa alcalina (ALP), con el objetivo de observar posibles signos de resistencia fisiológica o efectos antioxidantes inducidos por las dietas experimentales (Aguilera *et al.*, 2015).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 ACUACULTURA

La acuicultura se define como la cría y producción de organismos acuáticos, no solo con fines de seguridad alimentaria, sino que también para la restauración y protección de ecosistemas (FAO, 2022; Overton *et al.*, 2023). Se destaca por la producción de alimentos de alta calidad, ofreciendo alternativas sostenibles y saludables para el consumo, como las harinas y derivados, entre ellos el aceite de pescado. Además, es reconocida por su bajo impacto ambiental y una de las formas clave de producción alimentaria con mayor crecimiento (Naylor *et al.*, 2023). Según los datos de la FAO (2022), a nivel mundial la producción de pesca y acuicultura tuvo un crecimiento del 609% desde 1990, y alcanzó en el 2020 la cantidad de 177.8 Mt, de los cuales 157.4 Mt se destinaron para la demanda del consumo humano. En ese mismo año, se registró un total de 122.6 Mt, a nivel global en la producción acuícola, con un aumento del 18% desde 2015, de los cuales la producción del grupo de animales acuáticos (anfibios, moluscos y peces) alcanzó un total de 87.5 Mt para finales de 2020.

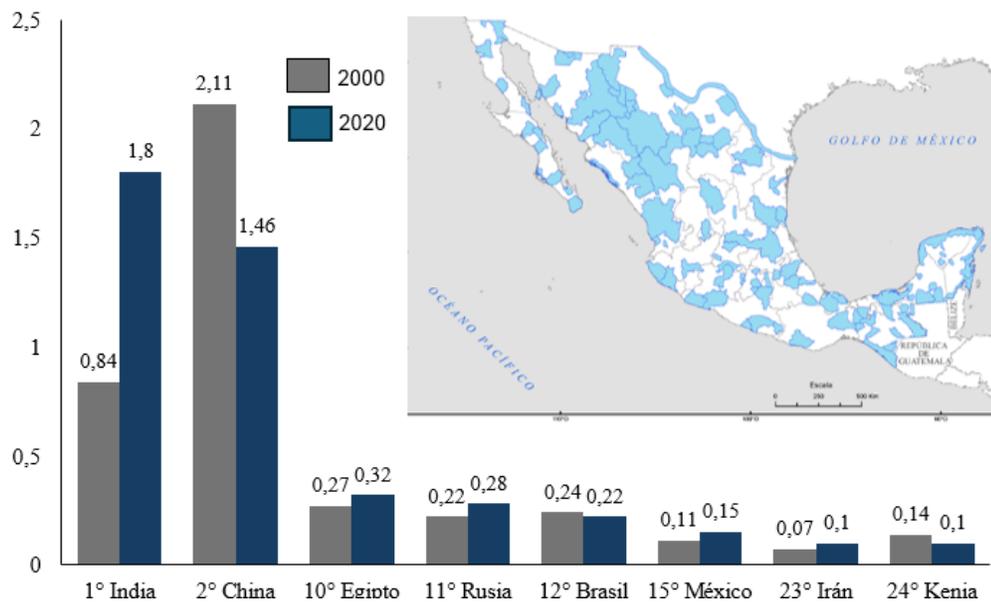


**Figura 1.** Ilustración gráfica de la FAO (2024) que muestra una comparación de los últimos años entre la pesca de captura y la acuicultura, expresada en millones de toneladas equivalentes de peso vivo.

Como se muestra en la Figura 1, la industria acuícola ha superado en el último año la pesca silvestre. Con la disminución continua de la pesca de captura, la acuicultura asumirá una

función cada vez más significativa dentro del sector productivo alimentario. (Godfray *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2016).

En 2020, entre los países con mayor producción acuícola destacaron India y, en primer lugar, China (Figura 2; FAO, 2022). En México, la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA), informó en 2023, que entre las especies con mayor demanda para el consumidor se encuentran los cultivos de camarón, bagre, trucha y tilapia, especies mayormente producidas en territorio mexicano (FAO, 2024). Por ello, México ocupa el lugar 15° de los mayores productores (Figura 2), proyectando un alcance total de 296 Mt para 2030, con un crecimiento estimado del 6.2% en la producción acuícola (FAO, 2022).



**Figura 2.** Ilustración gráfica de los principales productores de la industria pesquera en aguas continentales, con valores representados en millones de toneladas (datos de la FAO, 2022), con una ilustración de la CONABIO (2020) mostrando las regiones hidrológicas prioritarias en México.

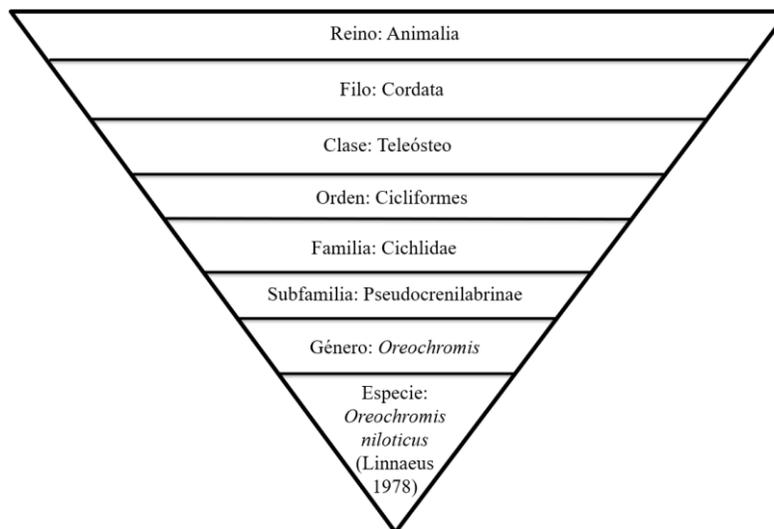
La industria alimentaria presentará grandes retos a futuro, debido a que en 2022 la Organización de las Naciones Unidas (ONU) informó que la población mundial ascendió a 7.9 mil millones de personas. Además, proyecta que en 2050 la población alcanzará los 9.7 mil millones, lo que representa un desafío para aumentar la producción alimentaria a nivel global (UNDESA, 2015; May, 2018). En el caso de México, no es la excepción: se reporta un total de 126 millones de habitantes, de los cuales el 22.5 % presenta carencias al no contar con alimentos de alto valor nutricional (CONEVAL, 2022). Por lo tanto, la

solución se encuentra en las prácticas acuícolas, que ofrecen un medio de producción eficiente, rentable y sostenible, capaz de generar alimentos proteicos de origen animal a bajos costos, siendo la mejor opción para satisfacer la demanda de alimentos (Garlock *et al.*, 2019; García-Medel, 2022).

## 2.2 TILAPIA DEL NILO (*Oreochromis niloticus*)

### 2.2.1 TAXONOMÍA

El término 'tilapia' es un nombre genérico para un grupo de peces tipo cíclidos, derivado del término “thalpi” significado de “pez” en idioma bantú. En base a los sistemas de Trewavas (1983), existen cuatro géneros: *Sarotherodon*, *Tilapia*, *Danakilia* y *Oreochromis*. El género *Oreochromis*, originario de África Central y Oriental, incluye más de 110 especies de peces cíclidos (Hallerman & Hilsdorf, 2014; Sánchez & Fortes, 2021). Dentro de este género destaca la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), la cual pertenece al filo Chordata, clase Actinopterygii, orden Perciformes y familia Cichlidae (Naz *et al.*, 2023).



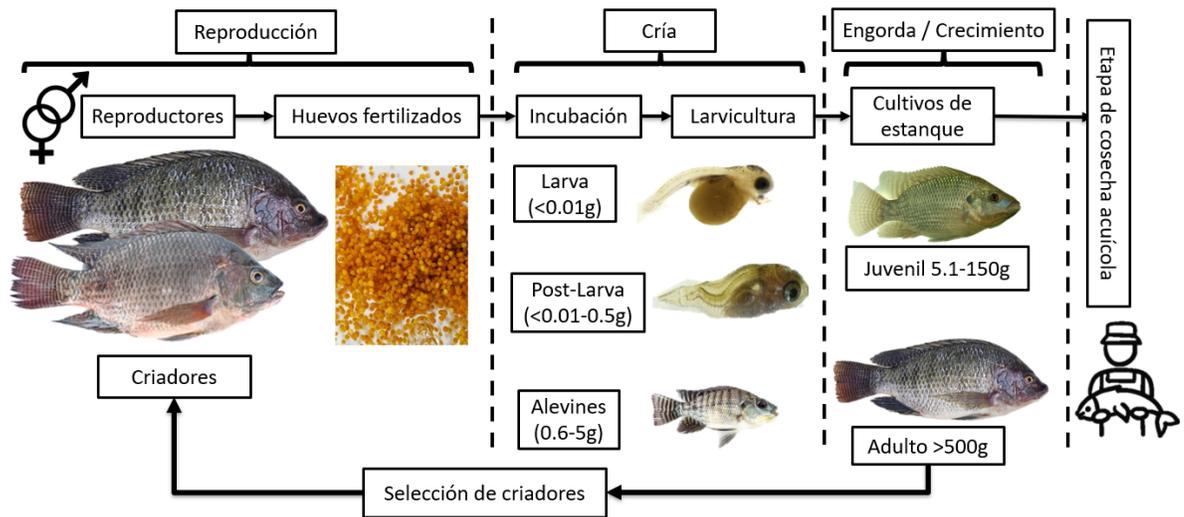
Con respecto a su línea filogenética, se ha demostrado una rama monofilética que comparte un linaje evolutivo común con otras especies estrechamente relacionadas dentro del género *Oreochromis*. Los análisis filogenéticos respaldan esta conexión, indicando relaciones genéticas significativas y se encuentra perteneciente al grupo de teleósteos (Triay *et al.* 2022). Los cíclidos son un modelo ideal para estudios de índole nutricional y

ecotoxicológica, ya que su sistema inmunológico puede servir como indicador ante diversas sustancias o condiciones ambientales (Bavia *et al.*, 2022).

### **2.2.2 CICLO DE VIDA**

La familia de las tilapias tiene una característica única debido a sus desoves asincrónicos, con intervalos de 2 a 7 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura), un buen fotoperiodo y parámetros fisicoquímicos del agua (Mashaii *et al.*, 2022; Perea *et al.*, 2022). Durante esta fase, las hembras liberan los huevos, que son fertilizados por los machos y se desarrollan en embriones (Figura 3), los cuales se nutren inicialmente del saco vitelino, que proporciona nutrientes esenciales para las larvas en desarrollo hasta que son capaces de alimentarse por sí mismas (Fujimura & Okada, 2007). Después de la eclosión, las larvas conservan el saco vitelino durante aproximadamente 3 a 5 días, tiempo en el cual absorben el vitelo y comienzan la transición hacia la alimentación exógena, etapa inicial para la supervivencia, por lo que, en condiciones de cautiverio, se recomienda una temperatura y calidad de agua adecuadas (Cioni *et al.*, 2000; Fujimura & Okada, 2007; Jantrakajorn & Wongtavatchai, 2015). Tras la absorción del saco vitelino, las larvas se convierten en alevines y comienzan a alimentarse de pequeñas partículas. A medida que alcanzan un peso de 1 gramo, se inicia el proceso de destete, una transición gradual del alimento natural a una dieta balanceada más nutritiva, que les permite adaptarse progresivamente hasta su incorporación a la etapa de vivero, favoreciendo su crecimiento (Azevedo *et al.*, 2015). Durante la fase de vivero, hasta alcanzar 10 g, los alevines crecen rápidamente en entornos controlados que minimizan la competencia y la predación. Dietas ricas en proteínas y una gestión adecuada, como el monitoreo del agua y una alimentación efectiva, son clave para garantizar su desarrollo y supervivencia (El-Sayed & Kawanna, 2007; Azevedo *et al.*, 2015). Una vez alcanzada la madurez sexual, aproximadamente a los 6 u 8 meses de edad, las tilapias consideradas como adultas pesarán alrededor de 1 kg (Senthilkumaran *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*, 2015). Una de las características más destacadas de la etapa adulta es su capacidad reproductiva prolífica, ya que las hembras pueden producir varios miles de huevos en un solo desove, lo que las hace especialmente valoradas en la acuicultura (Yoshida *et al.*, 2015; Mashaii *et al.*, 2022). Estas características esperadas están estrechamente

relacionadas con la tasa de crecimiento del organismo, la cual puede variar según factores como la densidad de población, la calidad del agua y la dieta. Entre estos, la alimentación juega un papel fundamental, ya que una dieta adecuada favorece un crecimiento acelerado y altos rendimientos en la producción (Shaker *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Etapas del ciclo de cultivo de *Oreochromis niloticus* (reproductiva, cría y crecimiento) hasta la etapa de cosecha (sacrificio). Se muestran las fases reproductiva, huevo, larva, postlarva, alevín, juvenil y adulta, según Pedrazzani *et al.* (2023).

### 2.2.3 PRODUCCIÓN DE TILAPIA EN EL MUNDO

*Oreochromis niloticus* fue una de las primeras especies cultivadas con fines productivos, existiendo registros de su crianza en Egipto desde hace más de 3,000 años. Aunque inicialmente fue considerada una especie parásita tras su introducción en varios países, en la actualidad se emiten numerosos permisos para su cultivo en sistemas acuícolas. Esto se debe a su rápida tasa de crecimiento, eficiencia en la conversión alimenticia (CA), resistencia, versatilidad en la alimentación y su alto valor nutricional como fuente de proteína. Estas características la han convertido en una de las variedades más comunes de cultivo en todo el mundo, destacando por su adaptabilidad a diversos sistemas de acuicultura y su resistencia a enfermedades (Waweru *et al.*, 2019; Sánchez & Fortes, 2021; Vajargah, 2021; Abwao *et al.*, 2021; Kamble, 2024).

En 2020, la producción global de tilapia del Nilo alcanzó aproximadamente 4.4 Mt (4,407.2 Mt en peso vivo), lo que resalta su importancia en la acuicultura (Yostawonkul *et al.*, 2023). Debido a su relevancia económica en numerosos países, esta especie se ha convertido en una de las tres más distribuidas a nivel mundial, posicionándose como una de las más relevantes (FAO, 2022; Geletu & Zhao, 2022). China sobresale como uno de los principales productores y consumidores de tilapia del Nilo (Xiong *et al.*, 2022).

Ante el notable crecimiento de la población a escala mundial y la urgente necesidad de garantizar fuentes de alimentos accesibles, el cultivo de tilapia se presenta como una solución viable para atender las demandas alimentarias, favoreciendo así el crecimiento de la acuicultura. Este sistema ofrece productos con alto valor nutricional a bajo costo, contribuyendo a la sostenibilidad alimentaria y fomentando el desarrollo socioeconómico, al generar ingresos para numerosas familias en zonas periurbanas y rurales (Vega-Villasante *et al.*, 2010; Betanzos *et al.*, 2019; Pomares & Velázquez, 2022).

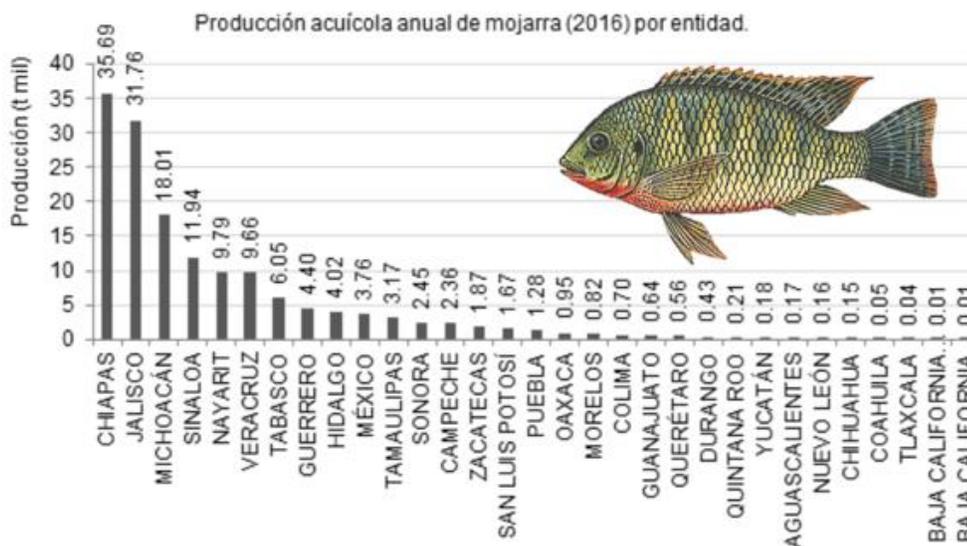
#### **2.2.4 TILAPIA DEL NILO EN MÉXICO**

La tilapia (*Oreochromis niloticus*) fue introducida en México en 1964, desde la Universidad de Auburn, EE. UU., para sembrarse inicialmente en Temascal, Oaxaca, y luego en la Presa Miguel Alemán, ubicada en Oaxaca, y posteriormente en la presa Infiernillo, ubicada en la frontera entre los estados de Michoacán. Tras su introducción, la tilapia continuó estableciéndose con éxito en diversos cuerpos de agua, lo que impulsó el crecimiento de la actividad acuícola en México (CONAPESCA, 2018; Reyes-Trigueros *et al.*, 2023).

Según lo ilustrado en la figura 4 (gráfica de la producción de tilapia, también conocida en México como mojarra), a partir de 2016 se destaca la participación de los principales productores de tilapia en el país, siendo Chiapas el líder con un total de 35690 t producidas, seguido por Jalisco con 31760 t y Michoacán con 18010 t. De estos, Chiapas sobresale por su gran importancia en la producción y comercio de peces en México (INAPESCA, 2018; Paredes-Trujillo *et al.*, 2022).

En un estudio reciente realizado por Antonio *et al.* (2024), se menciona que Chiapas sigue siendo uno de los principales productores de tilapia, junto con otros estados productores

como Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Michoacán, Tabasco, Veracruz, Hidalgo y Guerrero. Estos estados comercializan la tilapia en diversas presentaciones: entera y viva (24.3 %), en filetes (13.5 %) y como tilapia entera eviscerada, siendo esta última la más consumida, con un 62.2 % del total.



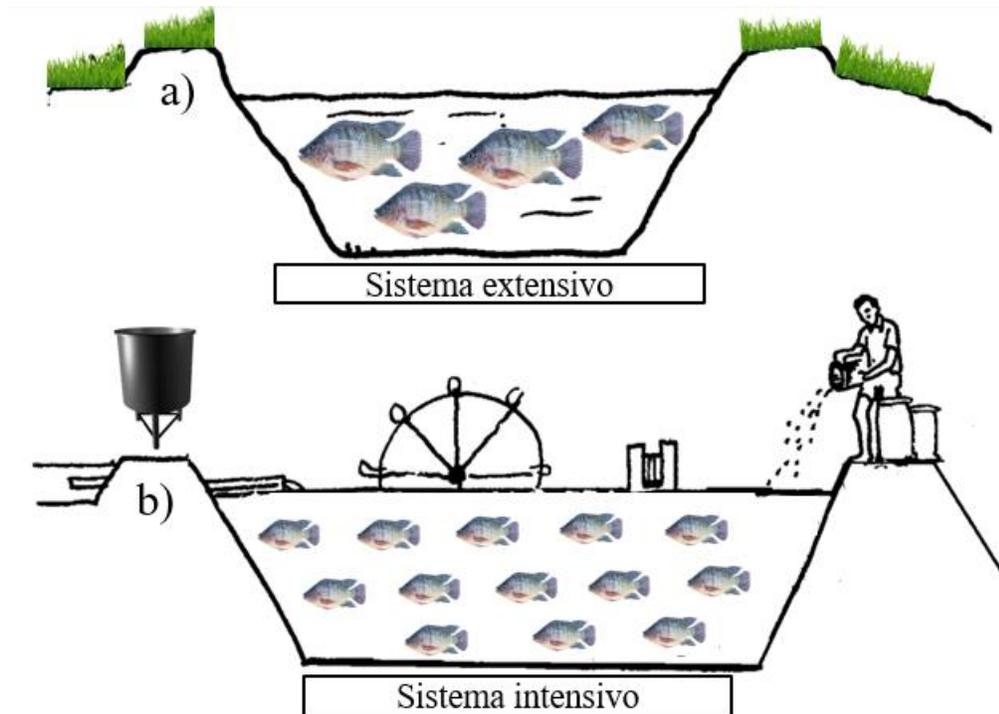
**Figura 4.** Ilustración gráfica de la producción anual de tilapia representada en miles de toneladas (CONAPESCA (2018)).

### 2.2.5 SISTEMAS DE CULTIVO

El cultivo de tilapia comenzó en 1924 en Kenia y ahora representa más del 60% de la producción acuícola total del país (Burma, 2018). El sector acuícola dedicado a la producción de esta especie busca constantemente la optimización mediante diversas estrategias, incluyendo la gestión de densidades de población y la formulación de dietas. Cabe mencionar que actualmente las explotaciones con altas densidades pueden mantenerse sin una mortalidad significativa, siempre que las condiciones ambientales se manejen adecuadamente (Biswas *et al.*, 2018; Kunda *et al.*, 2021), considerando que gran parte de estos cultivos se ubican en regiones tropicales y subtropicales (Waweru *et al.*, 2019; Kamble, 2024).

Un ejemplo es el control de densidad y la manipulación hormonal del género, manteniendo así poblaciones mono-sexuales, especialmente tilapias completamente masculinas, estrategia que mejora la eficiencia de producción, al prevenir la reproducción

descontrolada, y redirección de la energía al crecimiento y no a la reproducción, lo que permite prácticas de cultivo más intensivas (Alcántar-Vázquez, 2018; El-Azeem, 2023).



**Figura 5.** Ilustración gráfica que muestra la diferencia en la densidad poblacional entre un sistema extensivo (a) y un sistema intensivo (b).

La gestión nutricional de la tilapia del Nilo en sistemas de cría intensivos y semi-intensivos se basa principalmente en alimentos formulados (Konnert *et al.*, 2022). En contraste, los sistemas extensivos, caracterizados por una menor densidad poblacional (Figura 5), dependen de alimentos de origen natural, que van desde la productividad natural hasta los flóculos bacterianos (biofloc), junto con el suministro de alimentos complementarios de calidad (Aliabad *et al.*, 2022). Se sugiere que los sistemas extensivos favorecen un mayor crecimiento y reducen la incidencia de enfermedades a diferencia de los intensivos (Salger *et al.*, 2020). Sin embargo, la producción en sistemas que dependen de fuentes naturales de alimentos tiende a ser limitada, lo que reduce su viabilidad económica y su capacidad para satisfacer las altas demandas del mercado (Wang & Lu, 2016). En la acuicultura de tilapia, la composición nutricional del alimento es fundamental para los sistemas intensivos y semi-intensivos, ya que influye directamente en las tasas de crecimiento, la CA y la salud general de los peces. Por ello, la búsqueda de alternativas

para optimizar la dieta es un aspecto clave en la investigación y el desarrollo de este sector (Sandoval-Gallardo *et al.*, 2022). En estos sistemas, la prioridad es mejorar el rendimiento y la rentabilidad mediante estrategias que maximicen el aprovechamiento del alimento y mantengan la calidad del agua, incluso bajo altas densidades de cultivo (Khalil *et al.*, 2015; Wang & Lu, 2015; Munguti *et al.*, 2022).

En alimentos formulados, se ha observado que la sustitución parcial de la HP (un ingrediente comúnmente utilizado) por fuentes vegetales puede generar tasas de crecimiento óptimas, al mismo tiempo que reduce los costos de alimentación (Elyana *et al.*, 2018). Esto se debe a que los ingredientes vegetales contribuyen al crecimiento adecuado, logrando un equilibrio nutricional y disminuyendo la dependencia de la HP (Yousif *et al.*, 2019). Por esta razón, se busca incluir fuentes alternativas, como el uso de plantas acuáticas fermentadas e hidrolizados de proteínas derivados de desechos de pescado, los cuales han demostrado mejorar el desempeño en el crecimiento y la eficiencia alimentaria. (Hernández *et al.*, 2019; Sandoval-Gallardo *et al.*, 2022). Otro método implementado para mejorar los sistemas de producción es el uso de biofloc, una técnica que aumenta la rentabilidad al apoyar las primeras etapas de crecimiento de la tilapia y beneficiar a los productores (Munguti *et al.*, 2022). Con el uso de biofloc, se emplean sustratos orgánicos para fomentar el crecimiento de microorganismos y bioflóculos, los cuales proporcionan alimento adicional a los peces como una solución para satisfacer la demanda de alimento suplementario en los cultivos intensivos y semi-intensivos de tilapia. Esta tecnología no solo ayuda a reducir los costos de alimentación, sino que también mejora la sostenibilidad y rentabilidad de la acuicultura de tilapia (Samaddar, 2022).

### **2.3 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES**

Dentro de las necesidades nutricionales, las proteínas cumplen una función esencial para la formación de estructuras y el funcionamiento de los procesos metabólicos en el organismo (NRC, 2011; Teles *et al.*, 2020; Magbanua & Ragaza, 2024). La tilapia requiere una dieta con un alto contenido de proteína (Tabla 6), con un rango general del 24 % al 36 % dependiendo de la etapa de crecimiento. En el caso particular de los juveniles de tilapia del Nilo, se ha determinado que un nivel óptimo de proteína cruda entre el 28 % y el 32 % favorece un crecimiento máximo (Nguyen & Davis, 2009; Puppo *et al.*, 2017).

Con respecto al aporte proteico, es importante considerar el perfil de aminoácidos limitantes, siendo la metionina y la lisina particularmente relevantes para optimizar el aprovechamiento del alimento y favorecer su crecimiento (Nguyen & Davis, 2009; He *et al.*, 2016).

| a)                           | Requerimientos nutricionales |                  | b)           | Requerimientos de aminoácidos (g 16 g <sup>-1</sup> N) |                  |
|------------------------------|------------------------------|------------------|--------------|--|------------------|
|                              | (NRC, 2011)                  | (Niyibizi, 2023) |              | (NRC, 2011)  | (Niyibizi, 2023) |
| Proteína (%)                 | 30                           | 30               | Arginina     | 1.2  | 4.2              |
| Lípidos (%)                  | 5.7                          | 12               | Histidina    | 1.0  | 1.7              |
| Fibra (%)                    | 0.5                          | -                | Isoleucina   | 1.0  | 3.1              |
| Energía digestible (kcal/kg) | 3,400                        | 4,300            | Lisina       | 1.6  | 5.1              |
| Omega 3 (%)                  | 0.5                          | 1                | Metionina    | 0.7  | 2.7              |
| Omega 6 (%)                  | 0.5                          | 1                | Fenilalanina | 1.1  | 3.8              |
|                              |                              |                  | Treonina     | 1.1  | 3.3              |
|                              |                              |                  | Valina       | 1.5  | 2.8              |

**Figura 6.** Ilustración comparativa sobre los requerimientos nutricionales de la tilapia en etapa juvenil (a), haciendo énfasis en las necesidades de aminoácidos esenciales (b), con referencia al NRC (2011) y al trabajo de Niyibizi (2023). Los requerimientos de aminoácidos esenciales están expresados en gramos de aminoácido por cada 16 gramos de nitrógeno (g 16 g<sup>-1</sup> N).

El contenido lipídico en la dieta de la tilapia del Nilo es igualmente relevante, con recomendaciones generales entre el 5 y el 12 %, dependiendo de la etapa de vida y del sistema de cultivo empleado (NRC, 2011). Los lípidos funcionan como una importante reserva energética y contribuyen de manera crucial al proceso de asimilación de vitaminas liposolubles, siendo el aceite de pescado un ejemplo comúnmente utilizado (Dias *et al.*, 2022). Es importante considerar la composición de ácidos grasos, especialmente la presencia de ácidos grasos omega-3 y omega-6, los cuales desempeñan un papel clave en la salud y la respuesta inmunológica de la tilapia (Nuryanto *et al.*, 2022).

Se reconoce que la fibra dietética puede ayudar en la digestión y la salud intestinal, mejorando el rendimiento en juveniles de tilapia del Nilo (Daniel *et al.*, 2016). Niyibizi (2023) menciona que la cantidad adecuada de fibra dependerá de los ingredientes seleccionados y de cómo contribuyen al porcentaje total de la dieta.

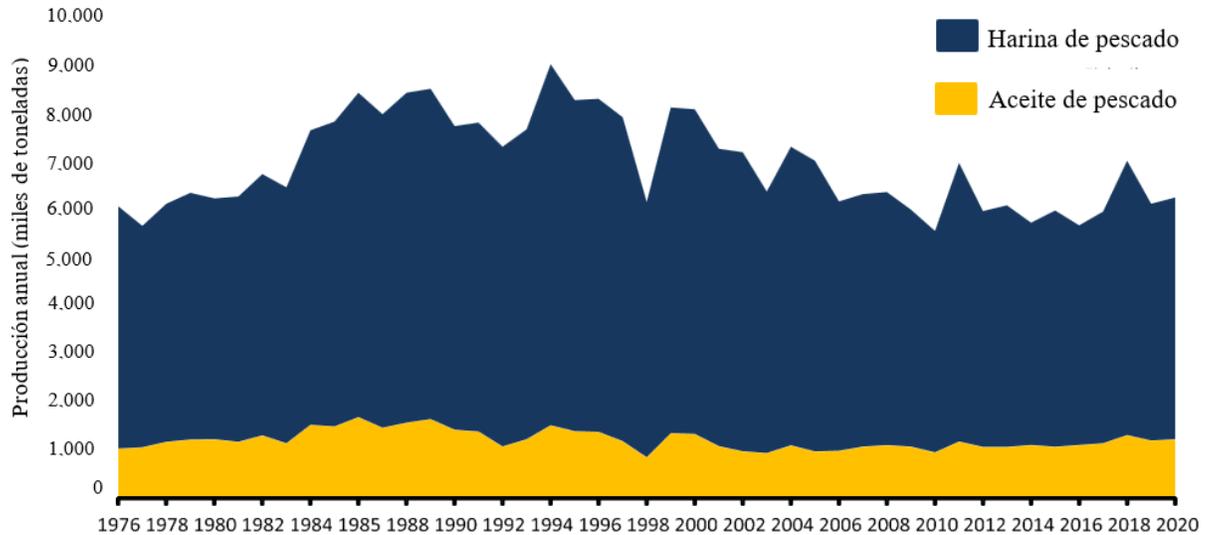
La energía metabolizable (EM) es un factor crítico en la formulación de dietas para la tilapia del Nilo, ya que influye en el crecimiento y las tasas de CA. El requerimiento de EM para esta especie se estima generalmente entre 2,500 y 3,000 kcal/kg de dieta (Tran-Duy *et al.*, 2011).

La digestibilidad de las fuentes de energía utilizadas en la dieta puede variar, y es esencial seleccionar ingredientes que mejoren la disponibilidad de energía. Estudios previos han indicado que la digestibilidad de la energía de diversas fuentes vegetales puede diferenciarse significativamente, afectando el rendimiento general del crecimiento (Dias *et al.*, 2022).

## **2.4 PRODUCCIÓN HARINA DE PESCADO**

La HP es considerada como el ingrediente proteico ideal para los peces por su elevado valor nutritivo y su palatabilidad (Sharda *et al.*, 2017). Dentro de la industria acuícola se utiliza ampliamente en la producción de alimentos peletizados debido a su aporte de ácidos grasos omega-3 como el DHA y el EPA, su excelente contenido de proteínas, con un perfil balanceado de aminoácidos esenciales, así como vitaminas. Este ingrediente es altamente palatable, digestible y favorece el desarrollo rápido de los animales (Hodar, 2020; Zlaugotne *et al.*, 2022).

Para el año 2030, se proyecta un aumento del 11 % en la producción de HP y un 13 % en el consumo de aceite de pescado en comparación con 2020. Según datos de la Organización de Ingredientes Marinos (IFFO, *International Fishmeal and Fish Oil Organisation*, por sus siglas en inglés), este incremento está relacionado con el crecimiento global y la demanda en la producción alimentaria de las granjas acuícolas (86 %), porcinas (9 %), avícolas (1 %) y animales de compañía (4 %), según estimaciones de la FAO (2022). Debido a su alta demanda (Figura 7), el costo por tonelada de la HP ha aumentado de \$608/t (en el año 2000) a \$1,472/t, y se estima que para 2029 el costo será de \$1,677 por tonelada (OECD/FAO, 2020; Nunes *et al.*, 2022).



**Figura 7.** Producción global de harina y aceite de pescado de 1976 a 2020. Datos proporcionados por la IFFO y Newton *et al.* (2023).

A pesar de ser reconocida como un ingrediente de alto valor proteico, la HP suele estar asociada con una producción ecológicamente insostenible, lo que impacta las poblaciones de pequeños peces pelágicos marinos y genera escasez, inestabilidad en los precios y dificultades para satisfacer la demanda (Yones & Metwalli, 2015; Schmidt *et al.*, 2016).

Por este motivo, el sector de la acuicultura está explorando alternativas de proteínas sostenibles que puedan disminuir la demanda de HP en la producción de alimentos para la acuicultura (Gokulakrishnan *et al.*, 2023).

## 2.5 ALTERNATIVAS DE HARINA DE PESCADO

La HP es la opción más utilizada por los productores como fuente de proteína (origen animal), abarcando desde un 30% a un 50% en toda la formulación dietaria. Sin embargo, considerando las preocupaciones económicas y ambientales derivadas del uso de este insumo, es necesario llevar a cabo más investigaciones sobre alternativas a la HP. Estas investigaciones deben centrarse sobre los efectos en el crecimiento, respuesta inmunitaria, resistencia y la reducción del estrés en los peces mediante diferentes dietas (Glencross *et al.*, 2019; Naylor *et al.*, 2021; Aragão *et al.*, 2022).

En la actualidad, existen alternativas proteicas a la HP para formular dietas, que se clasifican generalmente en tres tipos: proteínas de origen animal, vegetal o unicelular.

Estas últimas provienen de fuentes microbianas cultivadas, incluyendo bacterias, hongos, levaduras y microalgas (Zhang *et al.*, 2022).

Estudios realizados con el uso de harina de subproductos avícolas como fuente proteica, ha demostrado tener una eficiencia al reemplazar hasta un 65% de HP en dietas tanto para bagres como camarones, sin comprometer su crecimiento (Cruz-Suarez *et al.*, 2007; Hodar *et al.*, 2020; García-Pérez *et al.*, 2018).

Por otro lado, se han explorado alternativas provenientes de diferentes grupos taxonómicos, como el uso de harina de grillo (*Gryllus bimaculatus*), la cual en estudios recientes ha comprobado que una sustitución del 75% o hasta el 100% promueve una mejora significativa en la ganancia de peso corporal y en la tasa de supervivencia (S) específica del bagre (García-Pérez *et al.*, 2022). También existe el uso de la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*), la cual ha demostrado ser una alternativa prometedora para sustituir completamente la HP y promover el crecimiento en *O. niloticus* (Devic *et al.*, 2017; Nairuti *et al.*, 2021). De manera similar, ingredientes de origen vegetal, como algunos concentrados proteicos vegetales y extractos de hojas de guayaba y star gooseberry, han sido utilizados para mejorar la salud y el crecimiento de la tilapia del Nilo (Kamble *et al.*, 2024).

Otro ejemplo es la sustitución de HP por harina de soya en la dieta, un ingrediente con alto contenido proteico, bajo costo y fácil disponibilidad. Sin embargo, presenta limitaciones por sus posibles efectos negativos, principalmente por dos razones: primero, cuando se adiciona en concentraciones elevadas, puede comprometer tanto el crecimiento como la salud intestinal de los organismos acuáticos (Huang *et al.*, 2017; <sup>a</sup>Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2023). En segundo lugar, la incorporación de ciertos aminoácidos en estas dietas con harina de soya puede inducir desequilibrios en la proporción de aminoácidos esenciales, afectando así la salud de los organismos (Ayadi *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2019; Chama *et al.*, 2021). Es importante destacar que una sustitución inadecuada podría, en lugar de ser beneficiosa, afectar negativamente la producción, causando problemas patológicos en tejidos u órganos (<sup>b</sup>Wang *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2021).

## 2.6 BIOMASA BACTERIANA

Diversos tipos de microorganismos han sido utilizados en nutrición animal. Por ejemplo, las levaduras se han usado como agentes que mejoran la palatabilidad de las dietas al usarse en bajas concentraciones, mientras que diversos estudios han demostrado que la adición de biomasa de microalgas y cianobacterias a las dietas acuícolas tiende a promover efectos positivos en los consumidores (Gamboa-Delgado & Márquez-Reyes, 2016). La BB, específicamente FeedKind® Aqua Protein, desarrollada por la empresa CALYSTA (Reino Unido, Wilton/Teesside) (Figura 8), se destaca por sus características nutricionales, siendo una excelente fuente de proteínas con una composición equilibrada de sus aminoácidos, una alta digestibilidad y la capacidad de promover el desarrollo y la salud en animales acuáticos y terrestres, lo que la posiciona como una alternativa viable para reemplazar otros ingredientes proteicos (<sup>a</sup>Chen *et al.*, 2022). Lo anterior ha sido demostrado por Zhang *et al.* (2023), quienes evaluaron el uso de la BB (*Methylococcus capsulatus*) en dietas para lubina moteada, sustituyendo diferentes concentraciones de harina de soya. Los resultados mostraron mejoras significativas en la digestión y absorción de nutrientes, así como en la salud intestinal e inmunológica, evidenciadas por un aumento constante en la actividad de enzimas digestivas y una respuesta antiinflamatoria. Estos efectos también favorecieron una mayor diversidad y equilibrio de la microbiota intestinal. Cabe mencionar que la Unión Europea aprueba el uso de este ingrediente como aporte nutricional en las dietas (Overland *et al.*, 2010).

La formulación de FeedKind® incluye bacterias metanotróficas, como *Methylococcus capsulatus*, y bacterias del género *Bacillus*, que pertenece a la familia *Bacillaceae* y comprende 293 especies y subespecies. Estas bacterias grampositivas en forma de bastón pueden formar endosporas y adaptarse a condiciones aeróbicas o anaeróbicas facultativas (Patel & Gupta, 2020; Pei *et al.*, 2022). Junto a esta se encuentran las bacterias *Bacillus firmus*, utilizada como probiótico o agente biorremediador en acuicultura (Zainuddin *et al.*, 2022), y *Bacillus brevis*, cuya clasificación ha sido revisada tras un análisis de la secuencia genética del ARNr 16S y sus características filogenéticas, que la distinguen de otros grupos de bacilos. Como resultado de estos hallazgos, *Bacillus brevis* fue reclasificada bajo el género *Brevibacillus*, según lo propuesto por Shida *et al.* (1996) y

respaldado por estudios recientes (Liu *et al.*, 2024).

En otras especies, como los porcinos, se ha demostrado que *Brevibacillus brevis* tiene efectos nutricionales positivos. Al agregar un 10% de esta bacteria en las dietas para lechones, se observó un crecimiento significativo, reflejado en el aumento del peso final, así como una mejora en la CA, junto con un incremento en las actividades de proteasa, hemicelulosa y amilasa (Che *et al.*, 2016).



**Figura 8:** Proceso industrial de producción de biomasa bacteriana, en el que se detalla desde la fermentación con agua y partículas de oxígeno, nitrógeno y metano, hasta la separación de la humedad. Posteriormente, la biomasa se seca completamente y se almacena (Fuente: Empresa Calysta).

Estas bacterias, clasificadas como probióticas (concepto acuñado por Werner Kollath en 1953), contribuyen a mejorar la salud del organismo, y se han propuesto estrategias como su inclusión en la dieta junto con inmunoestimulantes para mejorar la resistencia y salud general de los peces (Gasbarrini *et al.*, 2016; Munir *et al.*, 2016; Yostawonkul *et al.*, 2022; Fauzi *et al.*, 2024). En este contexto, la adición de estos microorganismos mejora la actividad microbiana intestinal, favoreciendo el crecimiento y desarrollo, favoreciendo la salud general del organismo (Cavalcante *et al.*, 2020; Magouz *et al.*, 2023).

Además, diversas cepas bacterianas son reconocidas por su capacidad de remediación, una técnica emergente para eliminar sustancias tóxicas del medio ambiente mediante la degradación o transformación de una amplia variedad de compuestos, desde sustancias naturales hasta xenobióticos (Pankaj-Kumar, 2020).

## **2.7 DIGESTIBILIDAD Y ASIMILACIÓN DE ALIMENTOS**

La asimilación nutricional óptima depende de una cuidadosa selección y balance de los ingredientes de la dieta, mediante un análisis detallado de su composición nutricional y la evaluación de combinaciones que cumplan los requerimientos y características específicas de la especie objetivo, con el fin de asegurar la calidad, palatabilidad y digestibilidad (Kizil & Irudayaraj, 2018; Turchini *et al.*, 2018). Dentro de este contexto, las proteínas son nutrientes esenciales, ya que constituyen una fuente de aminoácidos fundamentales para la asimilación, el crecimiento y el bienestar de los animales en las granjas acuícolas (Hua *et al.*, 2019). Por lo tanto, el análisis de su calidad y absorción por parte del organismo es crucial para asegurar el máximo aprovechamiento de los alimentos suministrados (Trommelen & van Loon, 2021).

Algunos estudios relacionados con la digestión proteica en la acuicultura incluyen el análisis de la digestibilidad a través de excretas, empleando el uso de óxido de cromo y el dióxido de titanio en la dieta como marcadores indigeribles, que permiten calcular la digestibilidad del nutriente de interés. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la variabilidad de los resultados dependerá de factores como la composición de las heces, la pérdida de nutrientes durante la excreción y malas prácticas en la recolección de excretas (Wang *et al.*, 2018; Mmanda *et al.*, 2020).

Otro método es el uso de ensayos “*in vitro*”, que simulan la digestibilidad de proteínas mediante enzimas digestivas, con el fin de evaluar la capacidad de las proteínas de un alimento para ser digeridas y asimiladas en un entorno controlado. Este procedimiento replica el proceso digestivo, permitiendo calcular la cantidad total de proteínas digeribles presentes en la muestra (Venkata *et al.*, 2020). Sin embargo, un punto negativo de las pruebas “*in vitro*” es la variabilidad biológica o ambiental que se puedan llegar a presentar, un ejemplo es el estrés, ya que puede influir en el apetito de los peces de diversas formas,

afectando tanto la regulación homeostática como hedónica de la ingesta de alimentos (Conde-Sieira *et al.*, 2018).

### **2.7.1 ANÁLISIS ISOTÓPICO**

Entender la dieta de un consumidor es esencial para analizar las interacciones tróficas y el uso del hábitat en los ecosistemas acuáticos. Los organismos consumidores tienden a reflejar las características nutricionales e isotópicas de sus respectivas dietas, por lo tanto, los isótopos estables de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) y carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) se han utilizado como biomarcadores. Los análisis de valores isotópicos (a nivel de abundancia natural) proveen herramientas eficaces para rastrear las fuentes nutricionales y para analizar la asimilación de los componentes de la dieta en el consumidor (Buchheister & Latour, 2010; Frédérick *et al.*, 2012; Binstock *et al.*, 2023). El análisis isotópico es derivado de la práctica geológica, y actualmente representa una herramienta utilizada para abordar la reconstrucción dietaria de un organismo, a partir de una muestra de tejido muscular, hueso, hígado o piel (Boecklen *et al.*, 2011; Gamboa-Delgado & Márquez-Reyes, 2016; Binstock *et al.*, 2023). En el medio natural, este método ayuda a entender cómo las especies usan diversos elementos alimenticios, los cuales se ven reflejados en cambios en la composición de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en tejidos, reflejando así las fuentes de N y posicionando al organismo en un nivel trófico específico (Reitsema, 2013; García-Pérez *et al.*, 2018; Carrasco *et al.*, 2018). En condiciones de sistemas acuícolas, las técnicas isotópicas han asistido en la determinación de la asimilación y algunos parámetros metabólicos (Gamboa-Delgado, 2022). Esta técnica se fundamenta en la estabilidad o el equilibrio de los isótopos, que actúan como biomarcadores naturales, los cuales permiten reconstruir la historia dietaria de un consumidor o la de su entorno (Turchini *et al.*, 2008; Tulli *et al.*, 2020; Wilson & Altenritter, 2024).

El factor de discriminación isotópica se refiere a la diferencia isotópica que puede existir entre un consumidor y su dieta. En los tejidos ocurre una incorporación preferencial de las formas isotópicas pesadas ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) sobre las ligeras ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ), lo cual provoca un “enriquecimiento” isotópico en los consumidores. Los isótopos de N, que suelen fraccionarse más que los de C durante la asimilación, provocan en el consumidor un aumento trófico de aproximadamente 3‰ para  $\delta^{15}\text{N}$  y 1‰ para  $\delta^{13}\text{C}$ , respecto a su

respectiva dieta (Hussey *et al.*, 2010; MacKenzie *et al.*, 2011). Este fenómeno provoca diferencias isotópicas específicas entre los consumidores y sus dietas, conocidas como cambio trófico. Las mediciones de isótopos estables pueden además proporcionar información sobre la aptitud nutricional de un alimento o sus ingredientes, ya que, como se indicó previamente, los isótopos más pesados tienden a retenerse en mayor medida en los tejidos, mientras que las formas isotópicas ligeras son metabólicamente excretadas (Martínez del Río *et al.*, 2009). Se ha propuesto que los factores de discriminación isotópica pequeños podrían estar asociados con un mejor desempeño nutricional.

Comparando otros métodos, existe el análisis de la digestibilidad *in vitro* utilizando la técnica del pH-Stat, desarrollada por Pedersen & Eggum (1983), que, aunque ha sido útil para estimar el potencial digestivo, no se acerca a una predicción precisa. Es por este motivo que el uso de isótopos se ha empleado antes para determinar indirectamente la digestibilidad y directamente la asimilación de nutrientes, siendo una herramienta relativamente reciente en este campo. (Preston *et al.*, 1996; Cheng & Hardy, 2007, Gamboa-Delgado & Le-Vay, 2009; Felip *et al.*, 2012). Estos puntos evidencian que la metodología de isótopos estables resulta ser un recurso analítico importante que asiste en la valoración de la eficiencia nutricional de los alimentos y la aportación de N y C dietario (Badillo-Zapata, 2015), agregando la posibilidad de encontrar la viabilidad de nuevos ingredientes en la acuicultura (García-Pérez *et al.*, 2018).

Varias investigaciones han comprobado la utilidad del uso de mediciones isotópicas en estudios relacionados con la nutrición acuícola. Martínez-Rocha *et al.* (2012), emplearon en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), como modelo para evaluar y cuantificar las contribuciones del N dietético proveniente de la HP y harina de chícharo en combinación, destacando la relevancia de los factores de discriminación isotópica para mejorar la precisión en las evaluaciones dietéticas. De igual manera, Gamboa-Delgado *et al.* (2016) utilizaron una metodología similar para evaluar las contribuciones de la HP y harina de biofloc en la misma especie, confirmando la utilidad de este análisis. Por su parte, Badillo *et al.* (2014), emplearon isótopos de N para evaluar la retención de proteínas provenientes de harina de subproductos avícolas y la HP en dietas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). García-Pérez *et al.* (2018) aplicaron isótopos estables de N para estimar las

contribuciones de una harina de subproductos avícolas y la HP al crecimiento del bagre (*Ictalurus punctatus*), validando así las proporciones adecuadas para sustituir parcialmente la HP por harina de subproductos avícolas. En virtud de lo analizado, la integración del nitrógeno dietético y el uso de isótopos estables se presentan como herramientas analíticas clave para evaluar la asimilación del nitrógeno dietético, optimizar el crecimiento y garantizar la sostenibilidad ambiental mediante el uso de ingredientes alternativos, contribuyendo así al desarrollo de prácticas acuícolas más equilibradas y responsables. Cabe destacar que, a pesar de su utilidad, esta herramienta requiere de mayor investigación, ya que estudios sobre las tasas de recambio isotópico en tejidos musculares han reportado diferencias en los tejidos metabólicamente más activos, lo que podría generar discrepancias en las firmas isotópicas, especialmente en investigaciones a largo plazo (Buchheister & Latour, 2010; Jenkins *et al.*, 2020; Binstock & Mohan, 2023).

## **2.8 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS EN HÍGADO**

La función hepática de los peces es esencial en múltiples procesos metabólicos, pero está influenciada por diversos factores ambientales y dietarios. Por esta razón, el hígado es considerado un órgano modelo ideal para investigar la relación entre estos factores (Bruslé & Anadon, 2017). Entre los factores ambientales, la presencia de contaminantes, como compuestos químicos industriales en el agua afecta significativamente el metabolismo y la fisiología hepática de los peces, alterando su homeostasis y reduciendo su capacidad de detoxificación (Popović *et al.*, 2023). Un ejemplo es la presencia de hidrocarburos, derivados de la combustión incompleta de fósiles, madera, combustible o petróleo, los cuales pueden encontrarse en lagos, productos y cuerpos acuáticos, provocando efectos adversos para el medio ambiente y el ser humano (De Leo *et al.*, 2016; Frapiccini *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021). El factor alimentario es referente a los efectos de los bioactivos presentes en los alimentos que pueden brindar un efecto hepatoprotector o hepatotóxico (Ganesan *et al.*, 2017; Taheur *et al.*, 2022). Es fundamental evaluar la respuesta de los parámetros fisiológicos en la tilapia del Nilo, que representa un modelo clave para la investigación de mecanismos de defensa frente a exposiciones ambientales y dietarias, ya que el estrés oxidativo puede afectar su capacidad antioxidante y alterar la actividad fisiológica (Bavia *et al.*, 2022).

La evaluación de la actividad enzimática hepática es una herramienta útil para identificar enfermedades, diferenciar trastornos y determinar daño en el hígado (Lala *et al.*, 2023). Además, permite detectar posibles efectos tóxicos asociados a las dietas o a sus ingredientes, así como evaluar el potencial beneficioso de ciertos compuestos dietarios que podrían mitigar los efectos adversos del estrés inducido por agentes externos, como los xenobióticos. En este contexto, herramientas como los biomarcadores enzimáticos adquieren relevancia, al permitir una valoración de los cambios moleculares, celulares y fisiológicos que reflejan la exposición a factores ambientales que pueden afectar a los organismos acuáticos (Aguilera *et al.*, 2015; Saldaña *et al.*, 2024).

### 3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acuicultura enfrenta desafíos relacionados con el costo y la escasez de la HP, un ingrediente clave como componente dietético en especies acuáticas, entre ellas la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Esta situación ha generado la necesidad de buscar alternativas sostenibles que mejoren el rendimiento y reduzcan los impactos ambientales. En este contexto, la BB se presenta como una opción viable, ya que podría contribuir a disminuir los costos de alimentación y la huella de C de la industria. La tilapia es una especie ampliamente cultivada, lo que hace crucial una nutrición adecuada para optimizar su crecimiento. El uso de la BB en su dieta podría mejorar la asimilación de nutrientes y promover una mayor eficiencia en la producción. Para evaluar su asimilación, el uso de isótopos estables de C y N sería clave, permitiendo rastrear los nutrientes en los tejidos de los peces. Adicionalmente, se pretende estudiar el efecto de la BB en la protección hepática de los peces frente a contaminantes ambientales como los hidrocarburos, utilizando biomarcadores enzimáticos para evaluar su impacto sobre la actividad enzimática hepática.

## 4. HIPÓTESIS

La BB se plantea como una alternativa a la HP, debido a que cumple con características nutricionales fundamentales para tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y promueve el crecimiento, aportando N y C a la estructura muscular, además de tener un efecto hepatoprotector ante la presencia de xenobióticos como el diésel.

## 5. OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de una BB sobre el crecimiento, asimilación de nutrientes y protección hepática en tilapia del Nilo *O. niloticus* al aplicar diferentes niveles de sustitución de HP en dietas formuladas.

#### 5.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar los parámetros de rendimiento de la especie Tilapia del Nilo alimentada con dietas formuladas que incluyan diferentes niveles de BB como sustituto de la HP.
- 2) Estimar la asimilación de nutrientes de la BB y de la HP en el músculo de la tilapia mediante mediciones de isótopos estables de C y N.
- 3) Analizar a través de las variaciones isotópicas, los promedios de permanencia de los nutrientes en el tejido muscular, así como su contribución relativa al cambio isotópico en función de su crecimiento y tasa metabólica.
- 4) Analizar el efecto del consumo de diferentes niveles de BB sobre la respuesta enzimática hepática de tilapias expuestas a un hidrocarburo.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 INSTALACIONES DE ELABORACIÓN DE DIETAS Y BIOENSAYO

En las instalaciones de la Facultad de Agronomía (FA) de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se formularon cinco dietas experimentales, utilizando como únicas fuentes proteicas distintas proporciones de una HP comercial (ED&F Man, Guadalajara, Jalisco, México) y una BB FeedKind Aqua Protein, desarrollada por la empresa CALYSTA (San Mateo, California, EE.UU.) (Figura 9).



**Figura 9.** Ilustración de los dos ingredientes proteicos utilizados en el experimento: la harina de pescado (a) y la biomasa bacteriana (b).

**Tabla 1.** Evaluación bromatológica de los ingredientes empleados en la formulación de las dietas experimentales.

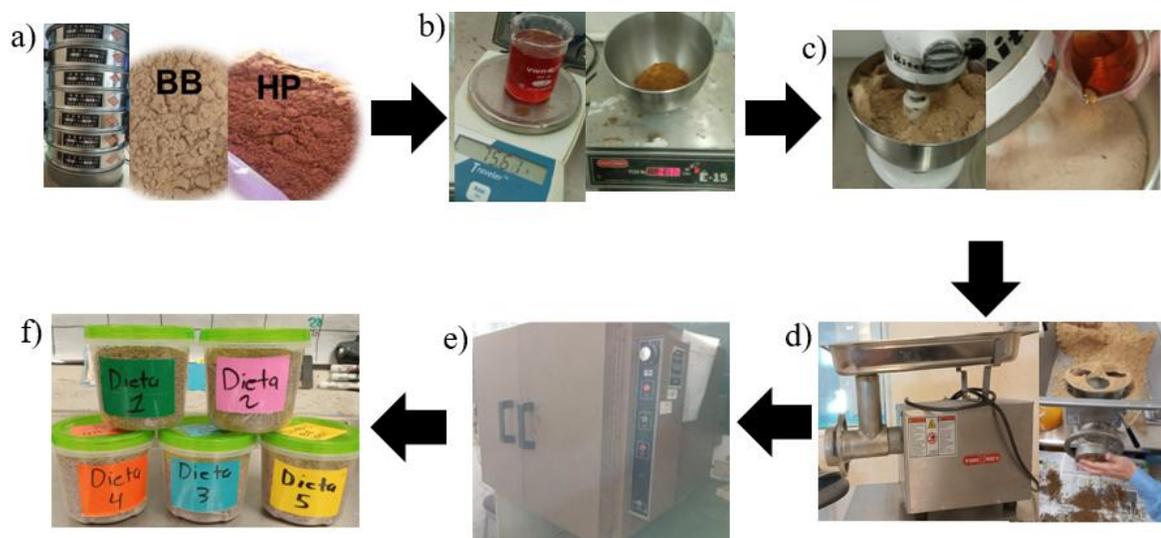
| <b>Ingredientes</b> | <b>Harina de pescado<br/>(ED&amp;F Man)</b> | <b>Biomasa bacteriana<br/>(CALYSTA)</b> |
|---------------------|---|---|
| Materia Seca (%)    | 92.51                                       | 94.72                                   |
| Proteína (%/BS)     | 58.59                                       | 67.35                                   |
| Lípidos (%)         | 10.83                                       | 8                                       |
| Cenizas             | 14.85                                       | 9.82                                    |

La elaboración de las dietas experimentales tuvo lugar en el Departamento de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Los análisis bromatológicos de los ingredientes (Tabla 1) y las dietas (Tabla 2) se realizaron en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos de la FA y el Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la U.A.N.L.

El análisis de isotópico fue realizado en las instalaciones del área de isótopos estables, del Departamento de Ciencias Vegetales de la Universidad de California, Davis. Los estudios enzimáticos de ALP, CAE y GST, se llevaron a cabo dentro del Laboratorio de Producción Acuícola de la FMVZ de la UANL.

## 6.2 DIETAS EXPERIMENTALES

La elaboración del alimento se realizó en el laboratorio de Maricultura de la FCB, el 5 de marzo del 2024. Se diseñaron cinco tratamientos experimentales isonitrogenadas (40% de proteína cruda) que cubriera los requerimientos nutricionales de la tilapia publicados por NRC (2011). Estas dietas se formularon incluyendo como únicas fuentes proteicas, mediante una HP (ED&F Man) con 58.59% proteína, y una BB (FeedKind®) con 67.35% de proteína. La dieta control tuvo 100% HP y en las dietas experimentales se procedió a sustituir de forma gradual un 25 % la HP por BB (Tabla 2).



**Figura 10.** Ilustración general del proceso de manufactura de las dietas experimental para *O. niloticus* en presentación de pellet, tamizado de harina (a), pesaje individual (b), mezcla de ingredientes(c), obtención del pellet por el molino Torrey (d), alimento en la estufa de aire forzado (e), alimento envasado (f).

El proceso se comenzó con el pesaje de cada ingrediente de forma individual, aquellos con un peso menor a 100 g se midieron en una balanza (OHAUS TRAVELER®; Parsippany, Nueva Jersey, Estados Unidos), mientras que los mayores a 100 g en una báscula electrónica (TORREY E-15; Monterrey, Nuevo León, México), asegurado así el peso exacto de cada uno (Figura 10).

**Tabla 2.** Formulación de las cinco dietas experimentales para cría de tilapia *Oreochromis niloticus* (g/kg de dieta), empleada para el estudio de parámetros de rendimiento, crecimiento, función hepatoprotectora y la asimilación nutricional.

| <b>Dieta (g/kg)</b>              | <b>100HP</b> | <b>75HP:25BB</b> | <b>50HP:50BB</b> | <b>HP25:75BB</b> | <b>100BB</b> |
|----------------------------------|--------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
| Harina de pescado <sup>a</sup>   | 515          | 386.3            | 257.6            | 128.7            | 0            |
| Biomasa bacteriana <sup>b</sup>  | 0            | 125              | 250.2            | 375.25           | 500          |
| Aceite de pescado <sup>c</sup>   | 41           | 44               | 47               | 50               | 53           |
| Celulosa <sup>d</sup>            | 168          | 177              | 185              | 193              | 201          |
| Fécula de maíz <sup>e</sup>      | 261          | 252.7            | 245.2            | 238.05           | 231          |
| Alginato de sodio                | 10           | 10               | 10               | 10               | 10           |
| Premezcla vitaminas <sup>g</sup> | 2.5          | 2.5              | 2.5              | 2.5              | 2.5          |
| Premezcla minerales <sup>h</sup> | 2.5          | 2.5              | 2.5              | 2.5              | 2.5          |
| Total                            | 1000         | 1000             | 1000             | 1000             | 1000         |

<sup>a</sup> ED&F Man, Liquid Products (Guadalajara, Jalisco, México); <sup>b</sup>Feedkind, CALYSTA (Londres, Reino Unido); <sup>c</sup>Super alimento para masctos SPM, (Monterrey, N.L., México); Aviscel, <sup>d</sup>FMC Corporation (Cork, Irlanda); <sup>e</sup>Maizena®, Unilever Manufacturera, S. de R.L (Tepalcapa, Tultitlán, Estado de México); <sup>f</sup> Desarrollo de Especialidades Químicas DEQ (García, N.L., México); <sup>h</sup>

Premezcla de vitaminas (composición por kg), retinol, 4,000,000 IU; colecalciferol, 3,200 IU; tocoferol, 60 g; menadione, 16 g; tiamina, 24 g; riboflavina, 16 g; DL pantotenato de Ca, 30 g; piridoxina, 30 g; cianocobalamina, 80 mg; ácido ascórbico, 60 g; biotina, 400 mg; niacina, 20 mg; ácido fólico, 4 g.

<sup>d</sup> Premezcla de minerales (composición por kg): Co, 2 g; Mn, 16 g; Zn, 40 g; Cu, 20 g; Fe, 1 mg; Se, 100 mg; I, 2 g.

Los ingredientes fueron colocados individualmente en los recipientes correspondientes de 4.25 L de acero inoxidable, para después ser mezclados durante 8 minutos a una velocidad de 2rpm, utilizando una batidora modelo Classic KitchenAid White®, K45SSWH, Apodaca, N.L, México), tras lo cual, se incorporó cuidadosamente el aceite de pescado y se mantuvo la agitación durante 10 minutos adicionales.

Una vez obtenida una mezcla homogénea, se añadieron entre 350 y 600 ml de agua a 32°C y se continuó el mezclado a 3 rpm durante 10 minutos, hasta alcanzar una consistencia

similar a la de una masa de pan. La masa fue procesada en un molino de mesa para carne (Torrey, M22RW, Monterrey, México), obteniendo pellets de 1.6 mm de diámetro. Las porciones de alimento se distribuyeron en charolas individuales por dieta y se sometieron a secado en un horno de convección (Quincy Lab Inc 10GC) a 105 °C durante 15 minutos. Finalmente, los pellets se almacenaron en contenedores herméticos para su conservación y uso posterior.

## 6.3 ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS

### 6.3.1 MATERIA SECA (MÉTODO 967.03, AOAC)

Se empleó el método de secado en una estufa de convección forzada (Yamato DKM-310C, Scientific America®; Oven, Japan) para medir los sólidos excluyendo el agua en la muestra (Figura 11), considerando que los resultados son sensibles a las condiciones de secado, como el tiempo y temperatura (Thiex & Richardson, 2003).



**Figura 11** . Pesaje de muestras (a), muestras colocadas en la estufa de aire forzada (b).

Se seleccionaron las charolas y se precalentaron en la estufa a  $100 \pm 5$  °C durante 15 minutos, tras lo cual se enfriaron en un desecador por el mismo período. A continuación, se registraron los números de identificación y los pesos iniciales de las charolas, ajustándolos a cero mediante la tara.

En cada charola se colocaron 100 g de muestra de la dieta experimental, las cuales fueron

introducidas nuevamente en la estufa a  $100 \pm 5$  °C durante 16 horas para eliminar la humedad y garantizar una medición precisa de la materia seca (Undersander *et al.*, 1993).

Posteriormente, las charolas se retiraron de la estufa y se dejaron enfriar en el desecador. Finalmente, se realizó el pesaje final de los crisoles con las muestras secas.

$$MS = \frac{(C3 - C1) * 100}{C2}$$

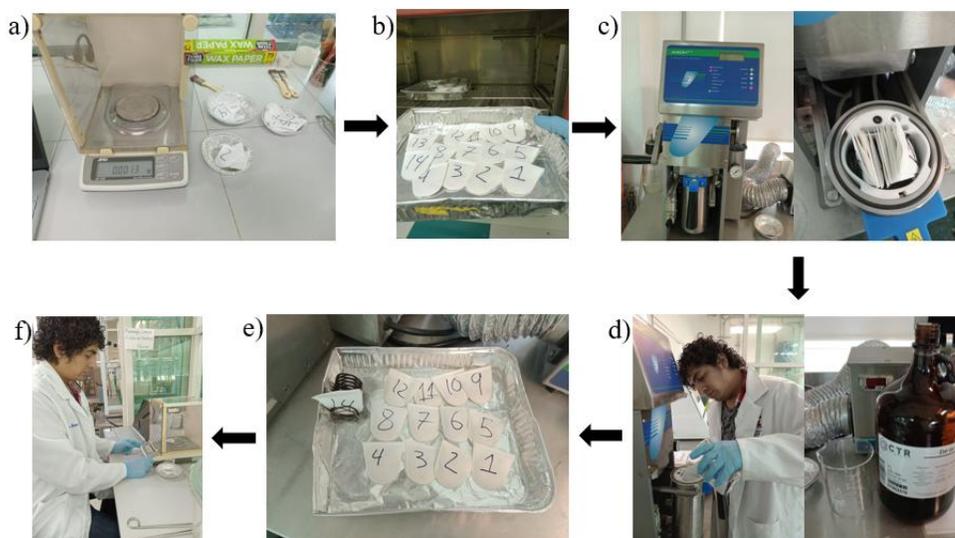
- MS 100° = Materia Seca
- C1 = Peso charola
- C2 = Peso muestra antes/estufa.
- C3 = Peso muestra después/estufa

### **6.3.2 GRASA (MÉTODO AM 5-04, AOCS)**

La determinación de lípidos se realizó mediante métodos de extracción con una solución de disolventes orgánicos (Figura 12), aprovechando la solubilidad de los lípidos. Se utilizó éter de petróleo como disolvente para la extracción de lípidos de los alimentos, ya que permite liberar y disolver los lípidos al romper enlaces con proteínas o carbohidratos (Ellefson, 2017).

Las bolsas de filtro ANK/XT4 se etiquetaron para su identificación, se colocaron en soportes y se pesaron en una balanza analítica. Posteriormente, se ajustó la tara de las bolsas (igualando a cero), se introdujo 1 g de muestra en cada bolsa y estas se sellaron herméticamente (Jonas *et al.*, 2020).

Las bolsas selladas se colocaron en una estufa precalentada a 100°C durante 5 horas para eliminar la humedad, mejorar la extracción de lípidos y aumentar la superficie efectiva de la muestra durante el proceso de extracción (Pomeranz & Meloan, 1994; Ellefson, 2017).



**Figura 12.** Proceso realizado para la obtención de la grasa total de las dietas experimentales: pesaje de las muestras (a), primer secado en la estufa (b), colocación de las muestras en el extractor de grasa (c), adición de la solución de éter de petróleo (d), retiro de las muestras y colado en la estufa por segunda vez (e), y, finalmente, pesaje de las muestras secas por segunda vez (f).

Las muestras secas y pesadas se colocaron en el extractor XT15 y se añadieron 350 ml de éter de petróleo como solvente. El proceso se llevó a cabo automáticamente a 90°C durante 40 minutos. Tras la extracción las muestras, se secaron (eliminar residuo del éter) en una estufa a 100-105°C durante 30 minutos, se enfriaron en un desecador durante 15 minutos y se pesaron para obtener los resultados finales del análisis de grasa (Jonas *et al.*, 2020).

$$GBS = \frac{P2 - P3}{P1} * 100$$

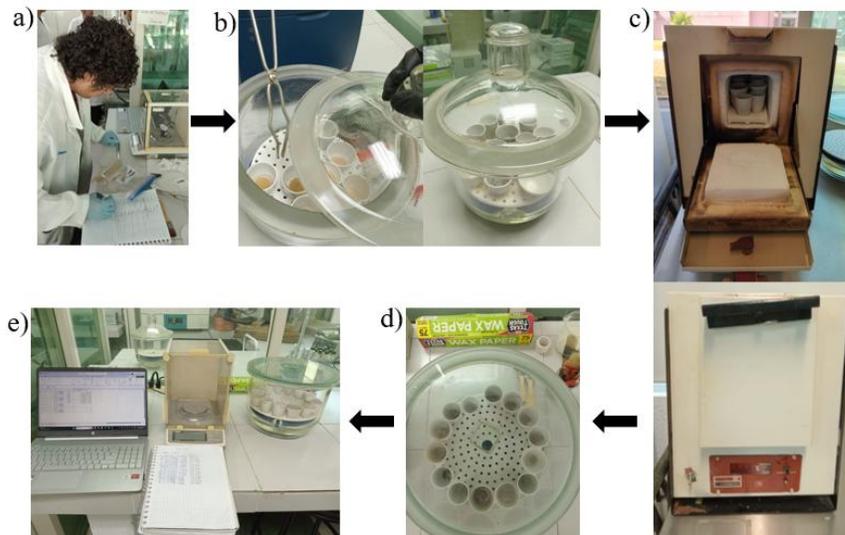
- MS 100° = Materia Seca
- P1 = Peso de la bolsa
- P2 = Peso de la muestra
- P3 = Peso de la muestra después del proceso

### 6.3.3 CENIZA (MÉTODO 942.05, AOAC)

Para determinar la materia inorgánica, se eliminó el agua y la materia orgánica mediante el calentamiento en un horno de mufla (Figura 13) (Lindberg Thermo Scientific®; Waltham, Massachusetts, EUA). Este análisis proporcionó una medida precisa del

contenido mineral o materia inorgánica total en la muestra (Thiex *et al.*, 2012).

Las muestras se incineraron a 530°C durante 3 horas en un horno de mufla, eliminando la materia orgánica y dejando solo las cenizas minerales. Después de enfriar en el desecador, se colocaron las muestras en una estufa a 100°C durante 15 minutos, se pesaron para calcular la cantidad de ceniza en cada muestra.



**Figura 13.** Pesaje de los crisoles y las muestras (a), muestras en el desecador (b), muestras en el horno (c), muestras colocadas en el desecador (d), registro de peso de las cenizas (e).

$$C\% = \frac{C1 - C3}{C2} * 100$$

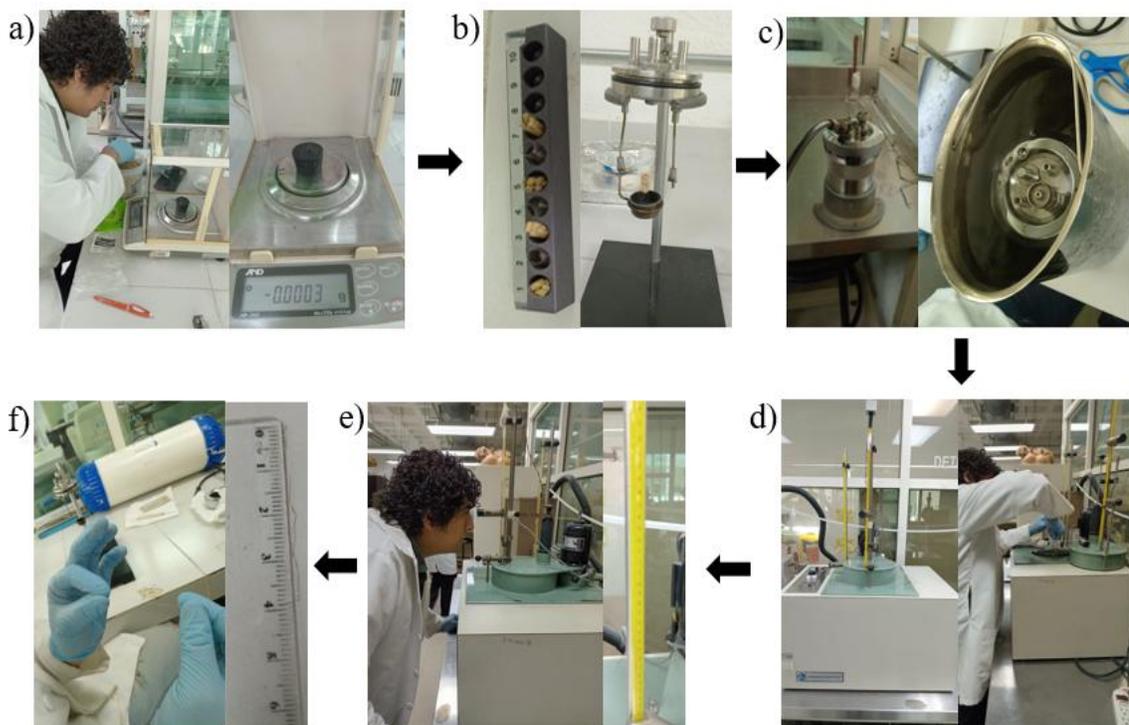
- C%: Ceniza
- C1= Peso del crisol
- C2= Peso de la muestra
- C3= Peso después del horno

$$CM\% = \frac{C\%}{MS\%} * 100$$

- CM%= Porcentaje de ceniza en base seca
- C= Ceniza
- MS%= Porcentaje de materia seca

### 6.3.4 ENERGÍA

Para este procedimiento las muestras se colocaron en cápsulas de gelatina como método para contener las muestras durante la combustión. (Hopper *et al.*, 2023).



**Figura 14.** Muestras pesadas y en capsuladas (a), muestra con alambre de combustión (b), muestras colocadas en la bomba de inducción saturada con oxígeno (c), muestras en la bomba calorimétrica (d), monitoreo de la temperatura para llevar a cabo la combustión de la muestra (e), se retira el residuo del alambre de combustión y se mide en centímetros (f).

Se pesó la cápsula destinada a contener la muestra y se registró su peso inicial. A continuación, se registró el peso neto de la muestra (Figura 14). Las muestras encapsuladas se colocaron en una bomba calorimétrica adiabática, la cual fue previamente presurizada con oxígeno.

Posteriormente, la bomba se sumergió en un calorímetro adiabático lleno de agua para igualar la temperatura del sistema, registrándose la temperatura inicial. La combustión se inició al hacer contacto con el alambre de ignición con la muestra, encendiéndola mediante corriente eléctrica, lo que provocó la liberación de calor (McGill *et al.*, 2004). Este calor incrementó la temperatura del sistema, y se registró la temperatura final del agua una vez que dejó de aumentar. Finalmente, esta temperatura final se utilizó para calcular la

cantidad de calor liberada durante la reacción de combustión, determinando así la energía contenida en la muestra.

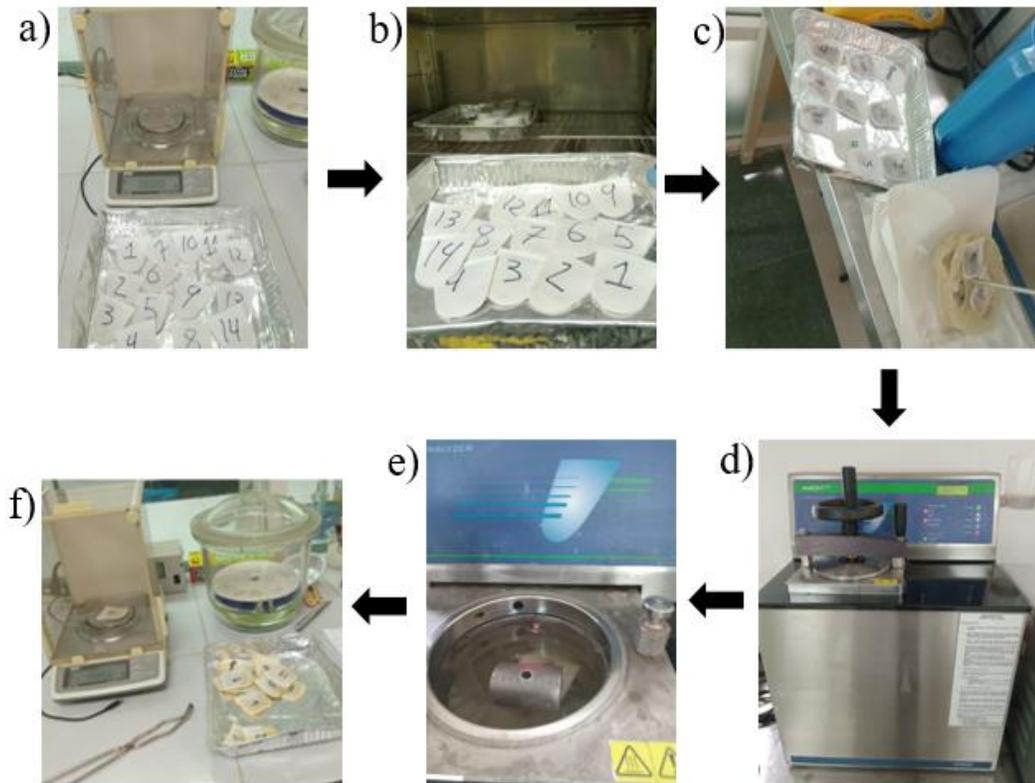
$$\text{Energía} = \frac{(2000 * T_f - T_o) - (10 - R_a) * 2.3}{(C_2) - (3816 * C_1) * 1.09688368590794}$$

- E= Energía
- C1= Peso de la capsula
- C2= Peso de la muestra
- To= Temperatura inicial
- Tf= Temperatura final
- Ra= Restos de alambre

### **6.3.5 FIBRA (MÉTODO AM 6-05, AOCS)**

El proceso inició con la identificación y el registro del peso inicial de las bolsas de filtro F57 ANKOM, diseñadas para la retención de partículas finas según el método AOAC 962.09. Posteriormente, las bolsas se tararon en una balanza analítica y se introdujeron las muestras de las dietas en su interior.

Las muestras, en bolsas selladas, se procesaron mediante un analizador de fibra (Ankom, Nueva York, EUA), utilizando detergente neutro (NDF) y detergente ácido (ADF) como reactivos, siguiendo los procedimientos descritos por Katić *et al.* (2009) y Fahey *et al.* (2019) (Figura 15).



**Figura 15.** Ilustraciones del proceso de análisis de fibra para ambos métodos NDF y ADF, pesaje de las muestras en bolsas F57 (a), colocación de las muestras en la estufa (b), muestras en el separador (c), colocación en un analizador de fibra (d), monitoreo y adición de las soluciones correspondientes al proceso (e), segundo pesaje, posterior al secado en la estufa forzada (f).

El NDF separó los componentes de alimentos difíciles de digerir y se le agregó alfa amilasa con el fin de eliminar almidones. Mientras que el ADF se utiliza para eliminar las hemicelulosas y obtener un residuo con bajo contenido de N.

La hemicelulosa se calculó con la diferencia entre el NDF y el ADF. Finalmente, la lignina se obtuvo al tratar el residuo de ADF con ácido sulfúrico al 72%, lo que provoca la disolución de la celulosa. Al finalizar cada etapa (ADF, NDF y lignina) las bolsas con las muestras permanecieron en el horno (100-105°C), posterior a esto se tomó el pesaje de cada muestra (Fahey *et al.*, 2019).

Formula:

- Celulosa (%) = Residuo de ADF (%) - Lignina (%)
- Hemicelulosa (%) = Residuo de NDF (%) - Residuo de ADF (%)

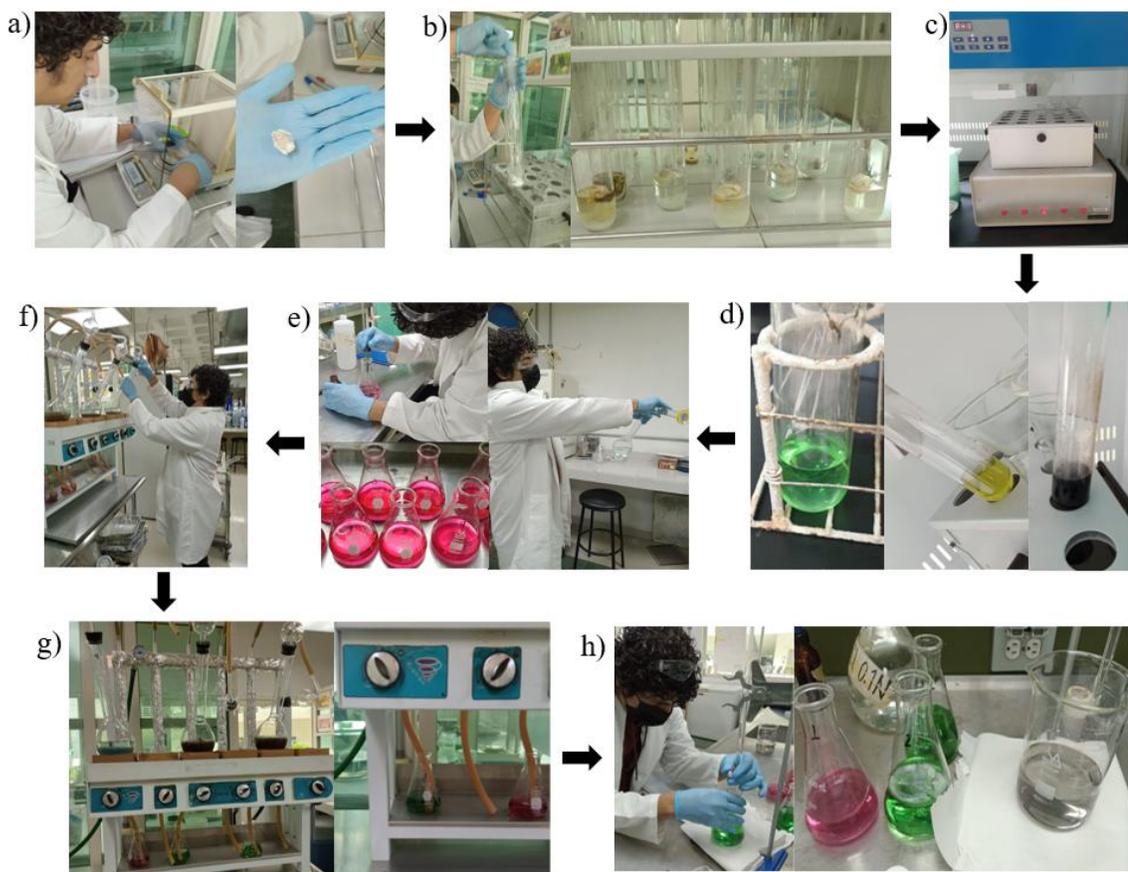
### 6.3.6 *PROTEÍNA*

El contenido proteico de las dietas se determinó mediante el método de Kjeldahl, basado en la medición del contenido de N en las dietas experimentales (Thompson *et al.*, 2002). Este método convierte el N proteico en iones de amonio mediante la ebullición de ácido sulfúrico en presencia de un catalizador. Posteriormente, la mezcla reactiva se vuelve alcalina, y el amoníaco liberado se separa mediante un proceso de destilación y se cuantifica mediante una titulación ácido-base (Figura 16).

Las muestras se pesaron en una balanza analítica y, una vez envueltas en papel, se introdujeron en tubos Kjeldahl Tecator junto con 2.5 g de sulfato de cobre como catalizador. Este procedimiento se realizó bajo una campana extractora (BIOBASE, FH1200X: Fremont, California, EUA). En los tubos Kjeldahl se añadió ácido sulfúrico concentrado junto con mezclas de sales catalizadoras, y las muestras fueron agitadas suavemente. Posteriormente, los tubos se colocaron en un bloque digestor y se calentaron a 400 °C durante 3 horas (Amin *et al.*, 2004).

Al finalizar la digestión, se permitió que las muestras se enfriaran. Luego, se transfirieron a matraces de bola, donde se añadieron 30 ml de agua destilada a temperatura ambiente (no menor a 25°C). Para prevenir la formación de espuma y evitar desbordamientos durante el proceso de ebullición, se añadieron pequeñas perlititas de vidrio a cada matraz (Singh *et al.*, 2021).

El contenido de los tubos Kjeldahl se transfirió a los matraces correspondientes siguiendo las etiquetas previamente establecidas. Estos matraces se colocaron en una parrilla en el aparato de destilación Kjeldahl, donde se encendieron las parrillas. Antes de colocar cada matraz en la parrilla, se añadieron con precaución 100 ml de hidróxido de sodio (NaOH al 40%) Se colocaron matraces Erlenmeyer con una cantidad de 100 ml de ácido bórico y un indicador Thashiro en el destilador (10 gotas) (Singh *et al.*, 2021).



**Figura 16.** Ilustración general del método de Kjeldahl, pesaje de la muestra, envuelta en papel (a), colocación de la muestra en el tubo Kjeldahl junto con sulfato de cobre y ácido sulfúrico (b), tubos colocados en el bloque digestor (c), cambio de coloración en las muestras tras 3 horas a 375°C (d), cambio de la muestra a matraces bola con reactivos para aforar y preparación de reactivos en matraces Erlenmeyer con solución rosa (e), colocación de ambos tipos de matraces en el equipo Kjeldahl (f), espera del proceso de destilación dentro del Erlenmeyer con solución verde (g), proceso de titulación utilizando probeta y ácido clorhídrico para determinar la concentración final (h).

Los matraces Erlenmeyer captaron el N liberado del matraz bola, hasta que su contenido cambió de color a verde y alcanzaron un volumen entre 150 y 200 ml, momento en el cual se retiró el matraz Erlenmeyer para iniciar la titulación. Se retiraron los vasos y se añadió ácido clorhídrico al 0.1N, (4ml de H<sub>2</sub>O y 8.33 ml de ácido clorhídrico) gradualmente, agitando hasta que se observó un cambio de color, que debía pasar de rosa a gris, marcando un punto importante en el análisis.

$$\% N = \frac{\text{ml HCl muestra} - \text{ml HCl blanco} \times \text{Normalidad del HCl} \times 0.014 \times 100}{W \text{ muestra}}$$

$$\%PC = (\%N) * (6.25)$$

$$\%PC (BH) = [\%PC (BS)] * MS/100$$

## 6.4 DISEÑOS EXPERIMENTALES

### 6.4.1 BIOENSAYO E INSTALACIONES

Este estudio contó con la revisión y aprobación del Comité de Bioética y Bienestar Animal de la FMVZ (Folio 036/2023). El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Producción Acuícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), ubicado en ExHacienda del Canadá, CP 66064, General Escobedo, Nuevo León, México.

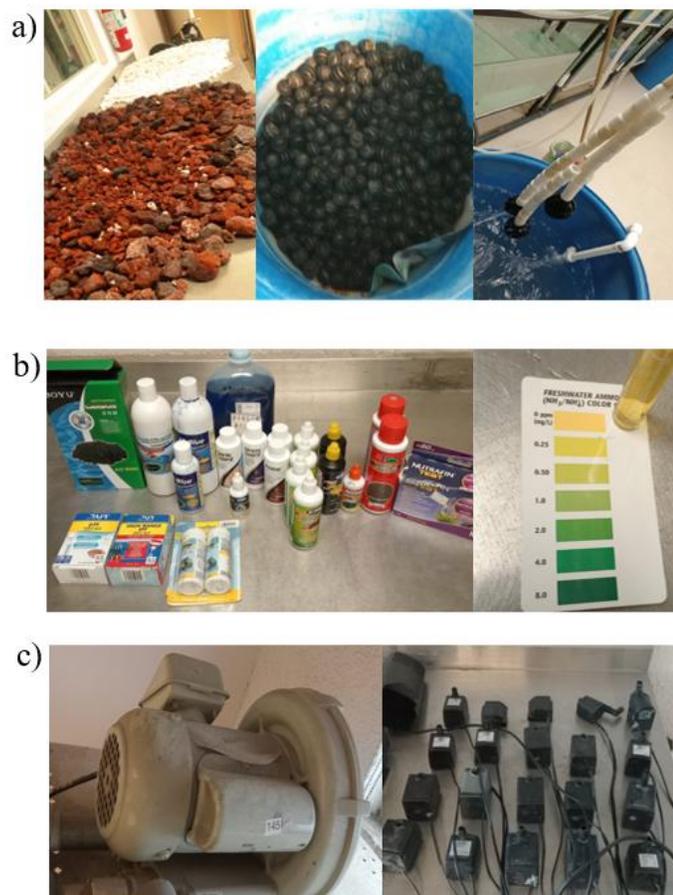
La sala de bioensayo contó con 20 acuarios de vidrio de 5 mm de grosor, cada uno con dimensiones de 125x40x40 cm y un volumen de 120 litros (Figura 17). Los acuarios contenían agua dulce y se equiparon con un termómetro de mercurio para la medición de la temperatura. Además, se implementó un sistema de inyección de aire mediante una bomba para garantizar la oxigenación del agua. Cada acuario fue acondicionado con un sistema de filtración individual ubicado en una de sus esquinas. Este sistema consistió en una bomba sumergible H-430 (marca BIOPROTM) y un filtro mecánico compuesto por una esponja filtrante dual (marca AZOO). Para la filtración biológica, se incorporaron 45 bioesferas (BIOPROTM) junto con piedra volcánica (Figura 18). La filtración química se realizó mediante la adición de 50 g de carbón activado (marca BOYU) y 50 g de zeolita (marca IMAGITARIUM). Previo al ingreso de los peces, los acuarios fueron sometidos a un proceso de desinfección. Inicialmente, se utilizó una solución de cloro y agua a una temperatura de 30 °C, dejándola actuar durante 4 horas. Posteriormente, se realizó una segunda limpieza con agua y un eliminador de cloro (marca BIOMA).

Tras este procedimiento, los acuarios se dejaron secar sin agua durante 48 horas para garantizar su correcta preparación antes del experimento. Para optimizar la disponibilidad de oxígeno en los acuarios (6 mg/L), se instalaron piedras difusoras conectadas a un sistema de tuberías mediante mangueras de silicona de 4 mm de diámetro. Este sistema contaba con válvulas para la regulación del flujo de aire y estaba vinculado a una bomba tipo blower (modelo PRB20-510, de fase única), la cual proporcionaba aireación y el oxígeno necesario a cada acuario. Con el propósito de mantener una calidad óptima del agua y garantizar una adecuada oxigenación, se implementaron recambios diarios de entre 20 y 40 litros de agua, además de un recambio semanal equivalente al 40 % del volumen

total del acuario. Este procedimiento permitió conservar los niveles recomendados de calidad del agua, manteniendo valores de 0 mg/L de amonio y nitritos y menores a 25 mg/L de nitratos.



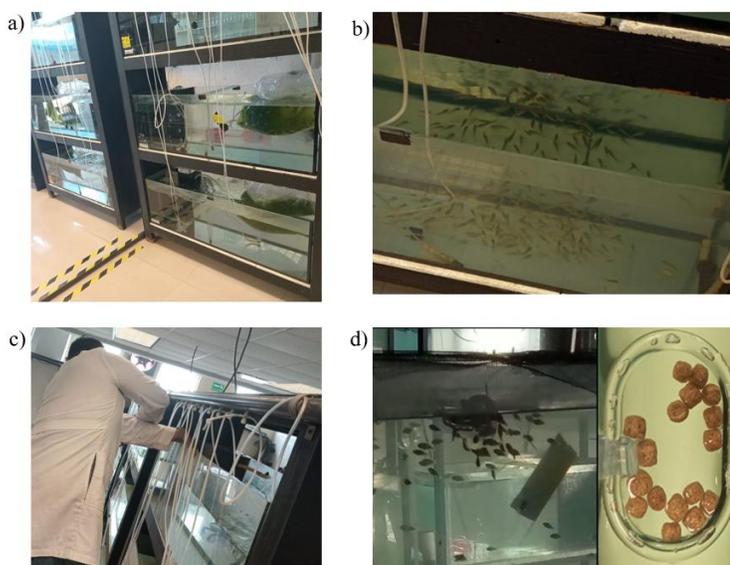
**Figura 17.** Instalaciones utilizadas durante los 30 días del bioensayo.



**Figura 18.** Material filtrante y equipo utilizado en los acuarios: canutillos, roca volcánica, bio-esferas y piedras difusoras (a); medidores de amoníaco y productos químicos como anticloro (b); y bomba para la circulación y oxigenación del agua en el acuario (c).

#### 6.4.2 UNIDADES EXPERIMENTALES

Se utilizaron tilapias del Nilo en etapa de alevín, con un peso de  $0.14 \pm 0.06$  g. Estos peces fueron adquiridos en una unidad de producción acuícola ubicada en Soto la Marina, Tamaulipas, México, la cual cuenta con certificación de sanidad acuícola. Para su traslado, fueron transportados en bolsas plásticas dobles, cada una con 1.5 litros de agua y una saturación de oxígeno superior a 4.5 ppm. El transporte tuvo una duración de cinco horas hasta su llegada a las instalaciones del laboratorio de Producción Acuícola de la FMVZ de la UANL.

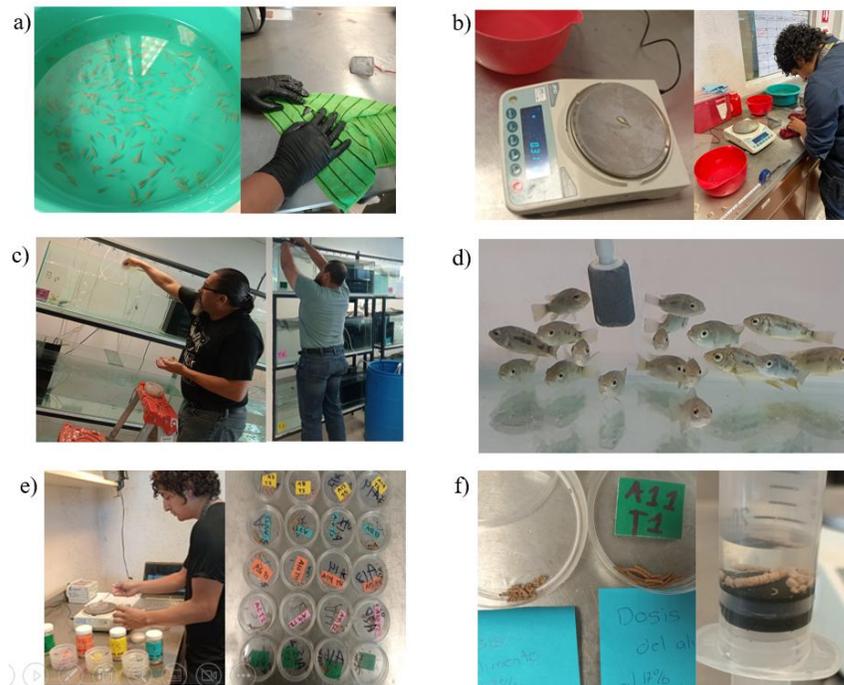


**Figura 19.** Arribo de los peces (aclimatación en los acuarios) (a), inicio del periodo de cuarentena (b), monitoreo de la calidad del agua (c), comienzo de la alimentación con alimento comercial (d).

Dentro de la sala de bioensayo, los alevines fueron distribuidos en tres peceras, donde se estableció un período de aclimatación de siete días, con un fotoperiodo de 12 horas de luz (Figura 19). Durante este tiempo, se monitoreó la producción de amonio y se suministró alimento comercial para adaptarlos a las condiciones locales y establecer un valor isotópico basal. Además, se registró la frecuencia alimentaria y se observó su comportamiento.

Al mediodía del séptimo día, se inició la distribución de los peces en los acuarios experimentales. Para ello, se realizó el pesaje de 100 unidades experimentales utilizando una báscula digital de precisión (FX-2000i Precision Balance, 2200g x 0.01g, A&D). A

partir de estos datos, se determinó el rango de pesos de los peces mediante un histograma (Figura 20). Con los rangos de peso establecidos, se procedió a distribuir los peces en los acuarios, manteniendo así un rango de pesos similar en cada acuario, y asignando un peso inicial (biomasa) para cada acuario y tratamiento, los cuales fueron organizados en bloques aleatorios.



**Figura 20.** Retiro del exceso de agua en los peces con toallas húmedas (a), primer pesaje (histograma) (b), distribución de los peces en los acuarios (c), inicio del experimento con 18 peces por acuario (d), ajuste diario de la cantidad de alimento por acuario y recolección de los residuos de alimento (f).

### 6.4.3 ALIMENTACIÓN

La distribución de las dietas fue con un diseño completamente al azar y se efectuaron los tratamientos con 4 repeticiones (peceras) por tratamiento (18 peces por pecera). Los juveniles de tilapia fueron alimentados en una frecuencia de tres veces al día, a las 9:00, 13:00 y 19:00 horas, con sus respectivas dietas experimentales.

Se comenzó con una ración inicial de alimento equivalente al 15% de la biomasa total de alevines en el acuario. Para el segundo día del bioensayo, la cantidad de alimento se ajustó de acuerdo con los residuos de alimento del día anterior, aumentando o disminuyendo entre un 3% o 5% de dieta para la siguiente alimentación.

## 6.5 PARAMETROS DE RENDIMIENTO

Los parámetros de rendimiento de las unidades experimentales fueron registrados los días 0,15 y 30 del bioensayo (Figura 21), seguido por la estimación del peso total (biomasa) de cada acuario, el cual se determinó como la sumatoria de los pesos individuales de cada pez presentes en cada acuario. Para calcular los parámetros de rendimiento correspondientes, se aplicaron las fórmulas siguientes.

**Figura 21 .** Monitoreo constante del peso de los peces durante el bioensayo

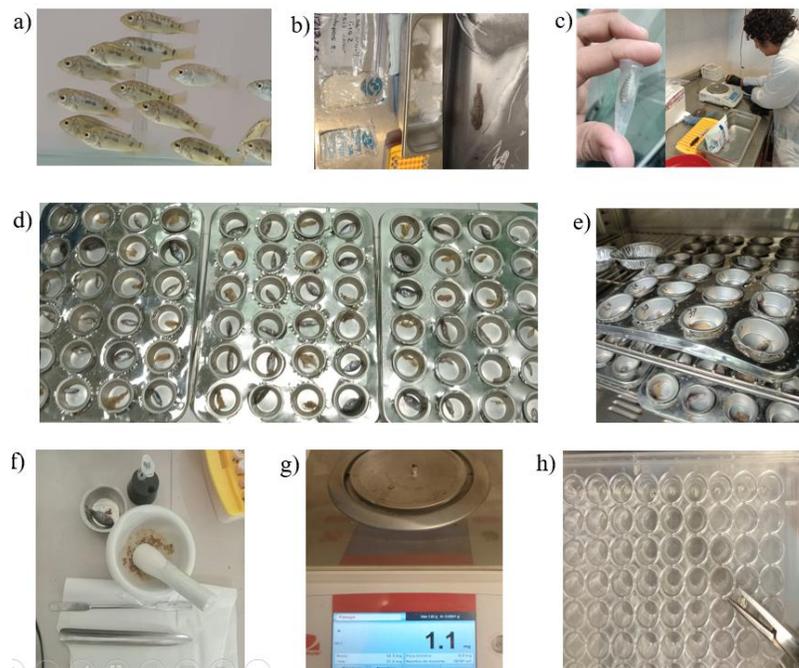


**Tabla 3.** Cálculos de los parámetros zootécnicos en animales de producción.

| Parámetros de rendimiento             | Fórmula   | Referencia                         |
|---------------------------------------|---|------------------------------------|
| Ganancia de peso del periodo (GP) (g) | $GP = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$                                      | Ramirez <i>et al.</i> , 2016       |
| Tasa de crecimiento promedio (g)      | $(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{tiempo del bioensayo}$           | Huarilloclla-Ramos, 2022           |
| Tasa de crecimiento                   | $(\text{Peso final} - \text{Peso inicial} / \text{Peso inicial}) * 100$             | Martin Penadillo, 2018             |
| Tasa de crecimiento específico (%)    | $(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) * 100 / \text{tiempo del bioensayo}$     | Pérez & Gómez <i>et al.</i> , 2018 |
| Tasa de conversión alimenticia (g/g)  | Total, del alimento consumido (g)/ganancia de peso(g)                               | Hernández-Lozano & Fajardo, 2019)  |
| Tasa de Supervivencia (%)             | $(\text{Número final de sobrevivientes} / \text{Número inicial de animales}) * 100$ | Mosquera-Medina, 2018              |

## 6.6 ANÁLISIS DE ISOTOPOS ESTABLES

Los días experimentales 0, 2, 4, 8, 15, 22 y 28 del estudio, se muestrearon (antes de la primera dosis de comida) aleatoriamente un pez por unidad experimental y en el día 30, un duplicado de peces. Esto con el propósito de obtener las muestras de tejido muscular para el estudio de asimilación de nutrientes mediante la información isotópica del nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) y del C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) aportado por las dietas experimentales. Para la obtención del tejido muscular (Figura 22), los peces pasaron por un proceso de eutanasia mediante un shock de hipotermia (aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la FMVZ; Folio 036/2023) y fueron almacenados para su posterior análisis en un refrigerador a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente el día 30 (final del bioensayo), se obtuvieron las muestras necesarios para el análisis isotópico (García-Ponce, 2012).



**Figura 22 .** Selección de los peces (a), eutanasia mediante shock térmico (b), registro individual del pez, encapsulado y almacenado en el congelador (c), recolección y clasificación de las muestras (d), secado de los peces en la estufa durante 24 horas a  $60^{\circ}\text{C}$  (e), homogenización de las muestras utilizando un mortero (f), pesaje de las muestras en cápsulas de estaño (g), registro de cada muestra en una caja de Petri para su posterior envío para el análisis elemental e isotópico (h).

Estas muestras pasaron 24 horas en una estufa de secado de convección forzada a  $60^{\circ}\text{C}$  (Heratherm OMS; Thermo Scientific), esto para poder obtener las muestras de forma

deshidratada, para posteriormente molerlas con la ayuda de un mortero y pistilo hasta obtener una consistencia fina y homogénea.

Las muestras se almacenaron en tubos de 1.5 ml tipo Eppendorf. Posteriormente, se pesaron con una balanza digital de alta precisión (modelo FX-2000i Precision Balance, con capacidad de 2200 g y precisión de 0.01 g, marca A&D) para obtener una muestra de  $1 \pm 0.1$  mg.

Estas muestras se colocaron en microtubos de tipo estaño (capacidad 0.5 ml), previamente marcados, los cuales se ubicaron en una placa ELISA de 96 pozos. Finalmente, las muestras preparadas se enviaron al Stable Isotope Facility de la Universidad de California, Davis, para su SIA de C y N (Gamboa *et al.*, 2016).

En la Universidad de Davis, se aplicó un análisis isotópico y elemental a las muestras de peces e ingredientes. Se utilizó un equipo PDZ Europa AMCA-GSL, acoplado a un espectrómetro de masas con flujo continuo de isótopos estables PDZ EUROPA 2020 (Gamboa *et al.*, 2020).

Cada que se analizaron 10 muestras, se analizó un estándar interno (nylon, albúmina), con el fin de mantener consistencia. Los valores isotópicos se expresaron en notación delta ( $\delta$ ), definida como parte de las unidades (partes por mil, ‰) de desviaciones comenzando con los valores isotópicos del N y C estandarizados por los materiales estándar de referencia (nitrógeno atmosférico) y para C Viena Pee Dee Belemnite (VPDB). Se empleó el término “factor de discriminación” con el propósito de representar las variaciones en las proporciones isotópicas entre un consumidor (ya sea el organismo completo o un tejido particular) y su alimentación, una vez logrado el equilibrio isotópico ( $\Delta^{15}\text{N}$  o  $\Delta^{13}\text{C}$ ) (Cherel *et al.*, 2005).

#### **6.6.1 DETERMINACIÓN DE LAS APORTACIONES NUTRICIONALES AL CRECIMIENTO**

Para evaluar las aportaciones nutricionales al crecimiento de los organismos estudiados, se implementó un modelo de mezclas isotópicas que toma en cuenta las variaciones isotópicas presentes entre los distintos insumos alimenticios (HP y BB) y el consumidor

(tilapia). Este modelo permitió estimar la proporción del crecimiento atribuible a las diferentes fuentes de nutrientes presentes en la dieta, considerando el tamaño de la muestra y la variabilidad isotópica.

A lo largo del período de estudio en la etapa del bioensayo, los peces incorporaron y almacenaron en su organismo los aportes dietéticos de N y C contenidos en los ingredientes de las dietas experimentales. Estos elementos (N y C) fueron analizados en función de sus valores isotópicos, tanto en las dietas como en sus ingredientes y en las muestras de tejido de los peces.

Las estimaciones de asimilación proporcional se derivaron de un modelo de mezcla isotópica de un isótopo y dos fuentes nutricionales (Phillips y Gregg, 2001, 2003). La firma isotópica del consumidor ( $\delta_c$ ) se puede expresar como una combinación lineal de las firmas isotópicas de las fuentes dietarias ( $\delta_A$  y  $\delta_B$ ), según la siguiente ecuación:

$$\delta_c = f_A \delta_A + f_B \delta_B$$

Donde:

- $\delta_c$ : firma isotópica de la mezcla obtenida del organismo en estudio.
- $\delta_A$  y  $\delta_B$ : firmas isotópicas de las fuentes A (HP) y B (BB), respectivamente.
- $f_A$  y  $f_B$ : fracciones proporcionales que indican la contribución de cada fuente a la dieta del consumidor.

Es fundamental que las fracciones de las contribuciones de las fuentes cumplan la restricción:

$$f_A + f_B = 1$$

Para resolver este sistema de ecuaciones y así estimar  $f_A$  y  $f_B$ , se reorganizó la ecuación original, lo que permitió expresar la fracción de la fuente A como:

$$f_A = \frac{\delta_c - f_B \delta_B}{\delta_A}$$

Sustituyendo  $f_B$  por  $1 - f_A$ , se facilitó la estimación de las proporciones de cada fuente en relación con las firmas isotópicas obtenidas en el estudio.

### **6.6.2 DURACIÓN PROMEDIO DE RESIDENCIA ELEMENTAL EN LOS TEJIDOS E ÍNDICE DE RECAMBIO DE NUTRIENTES**

Con el fin de obtener una interpretación metabólica a partir de los datos de las firmas isotópicas de carbono (C) y nitrógeno (N) obtenidos en los análisis, dichos valores se integraron en un modelo exponencial propuesto por Hesslein *et al.* (1993), el cual asocia los cambios isotópicos con el tiempo y el crecimiento. Este modelo permitió determinar, en tilapia, la contribución del metabolismo y del crecimiento somático al recambio isotópico observado.

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

- $C_{muestra}$ : Valor isotópico de la muestra de tejido muscular en el tiempo ( $t$ , días).
- $C_n$ : valor isotópico que las tilapias alcanzan cuando están en equilibrio con una dieta recién administrada.
- $C_0$ : El valor isotópico de N y C en el tejido muscular en equilibrio con la dieta inicial.
- $e$ : Constante matemática de Euler, aproximadamente igual a 2.71828.
- $m$ : Parámetro que representa la tasa de renovación del tejido metabólico. Este parámetro es desconocido y se estimó por medio de regresión no lineal iterativa.
- $t$ : Tiempo en el que se toma la muestra de tejido muscular (días).

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

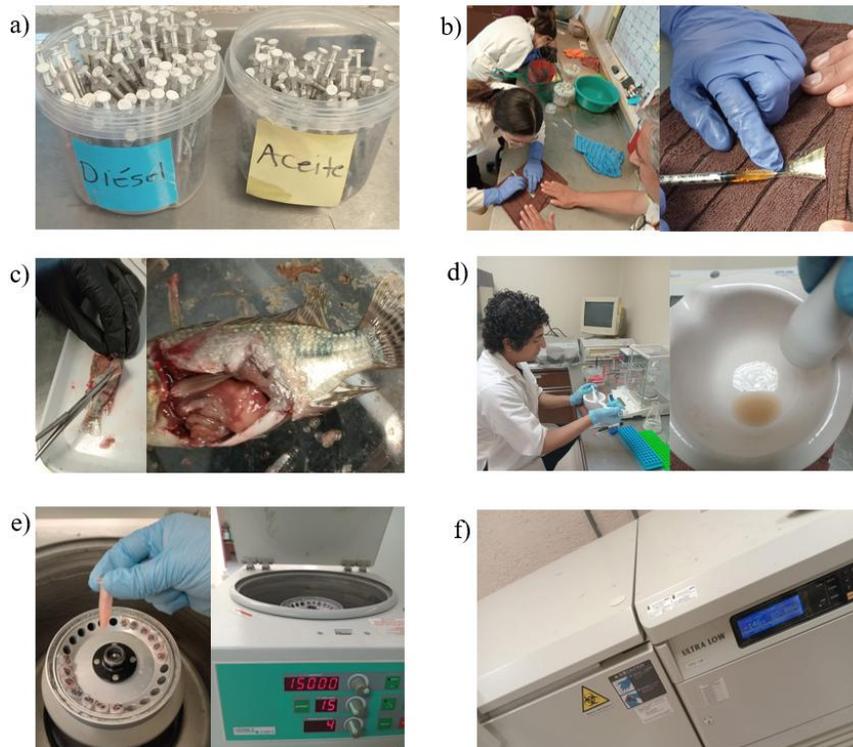
- $k$ : Constante de crecimiento requerida para en modelo de Hesslein.
- $W_f$ : El peso al final.
- $W_0$ : Es el peso inicial medido durante el ensayo biológico.
- $t$ : tiempo en días del bio ensayo.

## **6.7 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS**

### **6.7.1 EXTRACCIÓN DE MUESTRA HEPÁTICA**

El día 30, se seleccionaron aleatoriamente 20 peces de cada dieta experimental en cada tratamiento. De estos, aleatoriamente 10 fueron inyectados con 0.2 mL de aceite de pescado (Omegas Esenciales, SPM, Monterrey N.L.), como grupo control (A), mientras

que los otros 10 recibieron 0.2 mL de aceite de pescado comestible mezclado con 20  $\mu$ L/kg de diésel (D) (obtenido de una gasolinera en General Escobedo, N.L.). La dosis se determinó según Cruz-Valdez (2005) como no letal para los peces, y se fue administrada vía intraperitoneal, mediante una aguja de calibre 27G x 13 mm en una jeringa de 1 mL (Figura 23). Tras la inyección, los peces fueron retornados a sus respectivos acuarios y mantenidos bajo su tratamiento durante 24 o 48 horas. Posteriormente, la mitad de los organismos fueron sacrificados a las 24 horas mediante shock hipotérmico, sumergiéndolos en agua con hielo. El mismo procedimiento se realizó a las 48 horas, conforme a las Directrices para la eutanasia de animales de 2020 (AVMA). Este procedimiento es el segundo método más utilizado para la eutanasia en la acuicultura (Mocho & von Krogh, 2022).



**Figura 23.** Jeringas preparadas con ambos tratamientos, diésel y aceite (a), aplicación de los tratamientos vía peritoneal (b), recolección de hígado a las 24 y 48 horas (c), homogenización de las muestras utilizando un mortero (d), centrifugación de las muestras para obtener el paquete enzimático (e), almacenamiento de las muestras en un ultra congelador (f).

Después de la eutanasia, se realizó un corte longitudinal en el abdomen con una navaja de bisturí número 22 (HERGOM®) para obtener el hígado. Las muestras fueron colocadas

en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL y almacenadas en un ultracongelador a -150 °C (Sanyo VIP+ MDFC2156VANC, Japón) (Nunes & Costa, 2019). Una vez obtenidas todas las muestras, se llevó a cabo el estudio de la evaluación enzimática de ALP, CE y GST.

### **6.7.2 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS EN MUESTRAS HEPÁTICAS**

El análisis de los marcadores enzimáticos se realizó en el Laboratorio de Producción Acuícola de la FMVZ de la UANL. Los extractos enzimáticos se obtuvieron a partir de muestras hepáticas recolectadas de las unidades experimentales (*Oreochromis niloticus*). Estas muestras se homogeneizaron en un mortero de porcelana con una dilución de 1:10 de agua destilada (peso de la muestra: agua destilada, m/v) durante 4 minutos, proceso realizado en frío. Posteriormente, las muestras homogeneizadas se colocaron en tubos de 2 ml y se centrifugaron a 2000 g (Heathrow Scientific®, Estados Unidos) durante 15 minutos a una temperatura controlada (4°C) para obtener el sobrenadante. Luego, los sobrenadantes se guardaron en un ultracongelador a -80°C para posteriormente analizar la actividad de GST, CE y ALP.

### **6.7.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CARBOXILESTERASA, FOSFATASA ALCALINA Y GLUTATIÓN S-TRANSFERASA**

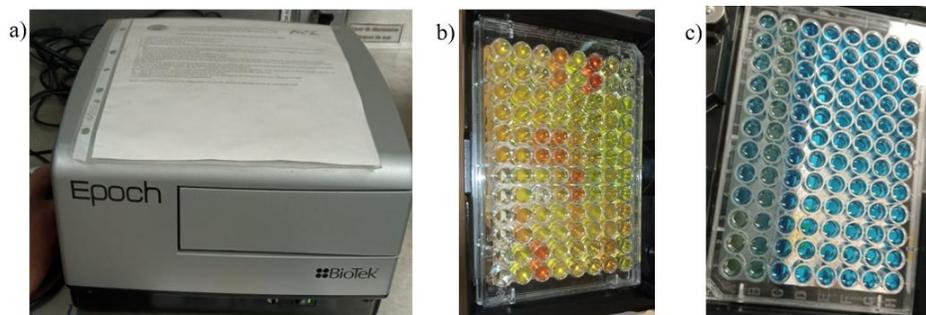
Para la realización de los métodos analíticos en el estudio de las enzimas hepáticas, se tomó como referencia el trabajo de Rincón-González (2022). Este estudio empleó la metodología de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como solución estándar para la calibración y determinación de las concentraciones de los extractos, conforme a lo descrito por Barriga *et al.* (2017).

El análisis de la GST se llevó a cabo mediante la técnica de Wilce & Parker (1994), adaptada al uso de microplacas. Para dar inicio a la reacción, en este paso se utilizaron 300 µL, con una mezcla la cual contiene 2,4-dinitrobenzeno-1-cloro, 100 mM de CDNB y 200 mM de L-glutatión con NaCl y colocando un tampón de fosfato de Dulbecco (KCl 2.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, NaCl 136.9 mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 8.9 mM, pH 7.2) y 10 µL de extracto enzimático, después de colocar el extracto enzimático, se registraron los valores de absorbancia a 340 nm cada minuto, durante un tiempo estimado de 12 minutos,

utilizando el lector de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., de Estados Unidos). La actividad de la GST se midió en términos de micromoles de sustrato transformado por minuto por miligramo de proteína, utilizando un coeficiente de extinción molar de  $5.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el CDNB (Brodeur *et al.* 2011; Barriga *et al.* 2017).

En el grupo de enzimas de las CAE, se empleó la metodología descrita por Ellman *et al.* (1961), adaptada para su uso de aplicación en microplacas según la técnica de Huang *et al.* (1997). Para iniciar la reacción de la CAE, se combinaron 200  $\mu\text{L}$  de solución tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.1), 10  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 100  $\mu\text{L}$  de un sustrato al acetato de p-nitrofenilo (2 mM). Se procedió a registrar la absorbancia de manera inmediata a 405 nm, con intervalos de 120 s durante un período de 10 min, utilizando un lector de microplacas. Para la actividad de la CAE, se midió a micromoles/min/mg proteína, tomando un coeficiente de extinción molar de  $18.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Aguilera *et al.*, 2012; García-Ponce, 2019).

El análisis de la ALP se realizó utilizando un sustrato de p-nitrofenilfosfato. Para la reacción en los pozos de las microplacas, se aplicó una porción de 10  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático, 200  $\mu\text{L}$  de tampón dietanolamina a 1,0 mM, con 50 mM de cloruro de magnesio y un pH de 9.8 (Ortiz-Tello, 2017). En la fase inicial de la reacción, se agregó el sustrato con una concentración de 0.4 mM. De forma inmediata, se registró la absorbancia a 405 nm, cada 120 segundos, durante un lapso de 10 minutos. La actividad enzimática fue expresada en micromoles/min/mg proteína (Barriga *et al.*, 2017).



**Figura 24.** Lector de microplacas espectrofotométrico (a), microplaca con extracto enzimático y el sustrato correspondiente, y microplaca con BSA para la medición de concentración proteica (c).

#### **6.7.4 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA**

Usando el método Bradford (1976), que emplea albúmina de suero bovino aplicado en microplacas, se determinó la concentración de proteína en los extractos enzimáticos. Se procedió con la construcción de una curva estándar utilizando cantidades variables de albúmina de suero bovino (BSA) disuelta en agua destilada, abarcando un rango de 0.05 a 0.5 mg por ml. Cada muestra fue replicada tres veces en diferentes pocillos de la microplaca para asegurar la precisión de los resultados. Tras la reacción de las muestras con la solución de trabajo, se permitió un tiempo de reposo de dos minutos antes de proceder a la lectura espectrofotométrica (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc.), la cual se realizó a una longitud de onda de 620 nm. Los valores obtenidos fueron expresados en miligramos de proteínas por mililitro (mg mL<sup>-1</sup>).

#### **6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizaron análisis estadísticos con el propósito de verificar la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas. Para evaluar las diferencias significativas entre los parámetros de rendimiento, se aplicó un ANOVA de una vía. En el caso de haberse detectado diferencia significativas, se realizó comparaciones múltiples de medias mediante la prueba de Tukey, con el fin de identificar diferencias entre las variables derivadas de los tratamientos. Para el análisis de biomarcadores enzimáticos y la comparación de las actividades enzimáticas, también se empleó la prueba de Tukey.

Para el estudio de isótopos estables y la comparación de las proporciones de N y C aportadas por los ingredientes en las dietas, se establecieron las proporciones teóricas durante la fase de formulación (por ejemplo, 50 % de proteína proveniente de HP y 50 % de proteína de BB). Posteriormente, se analizaron las fracciones de N y C asimiladas en el tejido muscular de los peces (proporciones observadas). Para evaluar la correspondencia entre las proporciones teóricas y las observadas, se aplicó una prueba de bondad de ajuste Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ), con un nivel de significancia de 0.05. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS 17.0 (SPSS Inc.), con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 DIETAS EXPERIMENTALES

De acuerdo con los parámetros establecidos por la AOAC (1995), los resultados de los análisis proximales de las cinco dietas elaboradas se observan en la Tabla 4, donde se muestra que las dietas experimentales resultaron ser isonitrogenadas e isoenergéticas con un promedio de 44.79% de proteína y 5.93 kcal/g de energía, respectivamente. Sin embargo, se presentaron diferencias significativas en los lípidos ( $p < 0.05$ ), siendo las dietas (50Bb:50FM) y (25Hf:75Bb) las que presentaron mayores contenidos, esto en relación con la cantidad de lípidos agregados.

**Tabla 4.** Evaluación de la composición nutricional de las cinco dietas experimentales diseñadas para determinar su contribución del nitrógeno dietario de la harina de pescado (HP) y de la biomasa bacteriana (BB).

| Valores proximales     | 100 HP | 75HP:25BB | 50HP:50BB | 25HP:75BB | 100BB |
|------------------------|--------|-----------|-----------|-----------|-------|
| Proteína cruda (%)     | 42.72  | 43.96     | 44.92     | 46.56     | 46.88 |
| Lípidos (%)            | 8.35   | 7.87      | 8.33      | 8.44      | 8.52  |
| Cenizas (%)            | 8.84   | 7.59      | 5.81      | 5.10      | 3.86  |
| Energía Bruta (Kcal/g) | 4593   | -         | -         | -         | 4714  |

\*El análisis proximal (%; g/1000 g; Kcal/g) de las dietas experimentales se llevó a cabo para estimar la contribución del nitrógeno dietario proveniente de la harina de pescado (HP) y de la biomasa bacteriana (BB).

### 7.2 ANÁLISIS DE RENDIMIENTO Y DESARROLLO DE LA TILAPIA

El peso inicial del experimento (día 0) no mostró diferencias significativas ni en el peso individual ni en la biomasa total por acuario ( $p=0.075$ ), por lo que los grupos experimentales tenían pesos homogéneos al comienzo del estudio. Para el día 15 (Tabla 5), a pesar de las variaciones en el peso individual (de  $3.36\pm 0.474$  g a  $4.24\pm 0.575$  g) y en la biomasa total (de  $59.71\pm 9.41$  g a  $75.17\pm 9.93$  g), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (con un valor  $p=0.230$  para el peso individual y  $p=0.243$  para la biomasa total). Lo anterior indica que, en el periodo evaluado, la sustitución parcial

o total de HP por BB no generó diferencias significativas. En el caso de la S al día 15 presentaron valores entre  $98.61 \pm 2.78\%$  y  $100\%$ , sin detectarse diferencias significativas ( $p=0.57$ ). La cantidad de peces por acuario se mantuvo estable en la mayoría de los grupos, con ligeras variaciones, pero sin diferencias estadísticamente relevantes ( $p=0.57$ ). Esto indica que la inclusión de BB en la dieta no impactó negativamente la S.

**Tabla 5.** Parámetros de rendimiento en la *O. niloticus*, del día 0 a los 15 días de bioensayo.

|                                   | <b>100 HP</b> | <b>75HP:25BB</b> | <b>50HP:50BB</b> | <b>25HP:75BB</b> | <b>100BB</b> | <b>SIG</b> |
|-----------------------------------|---------------|------------------|------------------|------------------|--------------|------------|
| Peso 0 (g)                        | 0.82±0.008    | 0.80±0.004       | 0.81±0.008       | 0.80±0.007       | 0.80±0.008   | 0.972      |
| Peso Biomasa 0 (g)                | 14.72±0.144   | 14.45±0.079      | 14.50±0.158      | 14.49±0.139      | 14.47±0.159  | 0.075      |
| Peso15 Inv (g)                    | 3.36±0.474    | 4.01±0.744       | 4.24±0.575       | 3.91±0.452       | 3.68±0.3427  | 0.23       |
| Peso Biomasa 15 (g)               | 59.71±9.41    | 72.160±13.40     | 75.17±9.93       | 70.36±8.14       | 66.20±5.90   | 0.243      |
| Ganancia de peso 15 (g)           | 2.54±0.48     | 3.20±0.74        | 3.43±0.58        | 3.10±0.44        | 3.36±0.036   | 0.218      |
| Cantidad de peces                 | 17.75±0.5     | 18               | 17.75±0.5        | 18               | 18           | 0.57       |
| Sobrevivencia (%)                 | 98.61±2.78    | 100              | 98.61±2.78       | 100              | 100          | 0.57       |
| Ganancia Biomasa Por Acuario 0a15 | 44.99±9.45    | 57.71±13.41      | 60.67±10         | 55.87±8.01       | 51.7325±5.80 | 0.23       |
| Consumo de alimento Inv 15 (g)    | 3.42±0.033    | 3.35±0.019       | 3.37±0.037       | 3.369±0.027      | 3.36±0.035   | 0.069      |
| Consum Alim por Acua15 (g)        | 60.67±0.41    | 60.38±0.328      | 59.77±1.17       | 60.64±0.49       | 60.48±0.623  | 0.633      |
| Tasa de Conversión alimenticia    | 1.39±0.27     | 1.1±0.31         | 1.01±0.20        | 1.10±0.15        | 1.18±0.12    | 0.212      |
| Tasa de crecimiento (%)           | 306.81±65     | 399.59±93.30     | 418.61±71        | 385.38±52        | 357.34±37.74 | 0.193      |

La ganancia de biomasa entre el día 0 y el día 15 varió según la dieta, con valores mínimos en la dieta 100HP (44.99±9.45 g) y máximos en la dieta 50HP:50BB (60.67±10 g), sin diferencias significativas entre ellas ( $p=0.23$ ). De manera similar, la CA presentó valores

de  $1.01 \pm 0.20$  g en la dieta 50HP:50BB y  $1.39 \pm 0.27$  g en la dieta 100HP, sin variaciones significativas ( $p=0.212$ ), lo que indica una eficiencia comparable entre las dietas. El consumo de alimento individual fue consistente entre los grupos (de  $3.35 \pm 0.02$  g a  $3.42 \pm 0.03$  g), sin diferencias significativas ( $p=0.069$ ). La tasa de crecimiento presentó valores entre  $306.81 \pm 65$  y  $418.61 \pm 71$ , sin diferencias significativas ( $p=0.193$ ). Estos resultados indican que la ingesta de alimento y el crecimiento en biomasa fueron similares entre las dietas. La ganancia de peso por pez, con valores entre  $2.54 \pm 0.48$  g y  $3.43 \pm 0.58$  g, no mostró diferencias significativas entre los grupos ( $p=0.218$ ). Todos los grupos experimentaron incrementos en el peso de los peces, pero estas diferencias no fueron suficientes para alcanzar significancia estadística.

Al final del experimento (Tabla 6), los peces que consumieron las dietas experimentales presentaron diferencias significativas en el peso individual y en la biomasa total. La dieta 25HP:75BB promovió el mayor peso individual y biomasa total, con valores de  $8.47 \pm 0.56$  g y  $143.85 \pm 10.59$  g, respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p=0.027$  y  $p=0.003$ ) en comparación con la dieta 100HP, que presentó los valores más bajos en estas métricas. Las dietas con proporciones de 75HP, 50HP, y BB100 no mostraron diferencias significativas entre ellas en el peso individual, a diferencia de la biomasa total, en la cual se muestra un grado de diferencia con respecto a las dietas 100BB y 75HP:25BB que muestran una diferencia con la dieta 25HP:75BB y la dieta 50HP:50BB con la 100HP.

En cuanto a la ganancia de peso y el consumo de alimento, los organismos que consumieron de 25HP:75BB y 50HP:50BB, resultando en una mayor ganancia de peso ( $129.36 \pm 10.71$  g y  $115.64 \pm 15$  g, respectivamente) y un mayor consumo de alimento ( $12.42 \pm 1.01$  g y  $12.01 \pm 1.02$  g, respectivamente). Ambos parámetros mostraron diferencias significativas ( $p=0.001$  y  $p=0.0001$ ), al ser comparados con la dieta 100HP. Las dietas con menor proporción de BB o basadas únicamente en un solo ingrediente proteico (100HP, 75HP:25BB y 100BB) mostraron menores valores en estos parámetros. Al final del experimento no se encontraron diferencias significativas en la tasa de CA ( $p=0.62$ ), ni en la S ( $p=0.076$ ).

En contraste, la tasa de crecimiento mostró diferencias significativas ( $p=0.003$ ), siendo la

dieta 25HP:75BB la que resultó en la mayor tasa de crecimiento ( $893.60 \pm 81.82$  g), seguida por la dieta HP50 ( $798.27 \pm 111.73$  g). Las dietas basadas principalmente en un solo ingrediente proteico mostraron las tasas de crecimiento más bajas.

**Tabla 6.** Parámetros de rendimiento en la *O. niloticus*, a los 30 días de bioensayo.

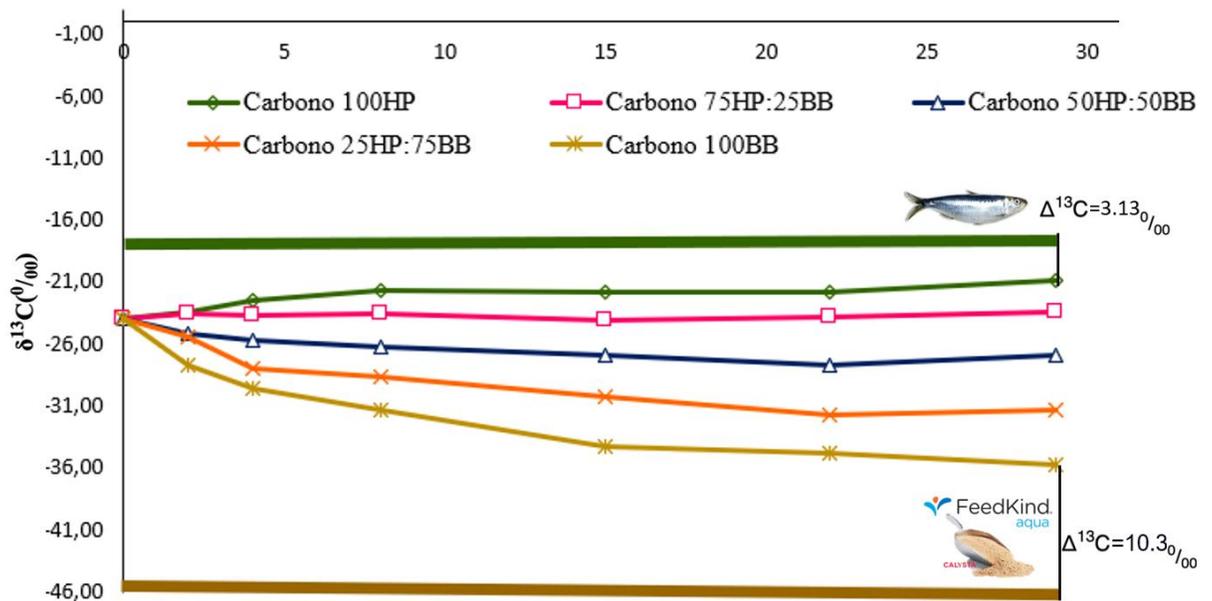
|                                      | <b>100 HP</b>             | <b>75HP:25BB</b>           | <b>50HP:50BB</b>           | <b>25HP:75BB</b>          | <b>100BB</b>               | <b>SIG</b> |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------|
| Peso 0 (g)                           | 0.82±0.008                | 0.80±0.004                 | 0.81±0.008                 | 0.80±0.007                | 0.80±0.008                 | 0.972      |
| Peso30 Inv(g)                        | 6.76±1.10 <sup>b</sup>    | 7.27±0.22 <sup>ab</sup>    | 7.88±0.69 <sup>ab</sup>    | 8.47±0.56 <sup>a</sup>    | 7.03±0.71 <sup>ab</sup>    | 0.027      |
| Peso Biomasa 30 (g)                  | 99.60±17.04 <sup>c</sup>  | 112.67±5.74 <sup>bc</sup>  | 130.14±14.85 <sup>ab</sup> | 143.85±10.59 <sup>a</sup> | 109.33±17.38 <sup>bc</sup> | 0.033      |
| Ganancia de peso Inv<br>30 (g)       | 5.94±1.10 <sup>b</sup>    | 6.465±0.21 <sup>ab</sup>   | 7.075±0.70 <sup>ab</sup>   | 7.66±0.57 <sup>a</sup>    | 6.22±0.71 <sup>ab</sup>    | 0.027      |
| Cantidad de peces                    | 15±1                      | 15.5±0.58                  | 16.5±1                     | 17±0.81                   | 15.5±1.29                  | 0.076      |
| Sobrevivencia<br>(%)                 | 83.33±5.32                | 86.11±3.21                 | 91.67±5.56                 | 94.44±4.54                | 86.11±7.17                 | 0.076      |
| Ganancia Biomasa<br>Por Acuario 0a30 | 84.88±16.98 <sup>c</sup>  | 98.22±05.67 <sup>bc</sup>  | 115.64±15 <sup>ab</sup>    | 129.36±10.71 <sup>a</sup> | 97.87±17.35 <sup>bc</sup>  | 0.003      |
| Consumo de alimento<br>Inv 30<br>(g) | 9.28±0.70 <sup>b</sup>    | 9.98±0.53 <sup>b</sup>     | 12.01±1.02 <sup>a</sup>    | 12.42±1.01 <sup>a</sup>   | 10.82±0.69 <sup>ab</sup>   | 0.00       |
| Consum Alim por<br>Acuario (g)       | 136.74±10.50 <sup>c</sup> | 154.78±11.84 <sup>c</sup>  | 198.62±25.27 <sup>ab</sup> | 211.38±21.93 <sup>a</sup> | 167.66±15.88 <sup>bc</sup> | 0.00       |
| Tasa de Conversión<br>alimenticia    | 1.640±0.20                | 1.58±0.12                  | 1.73±0.23                  | 1.65±0.25                 | 1.79±0.19                  | 0.62       |
| Tasa de crecimiento<br>(%)           | 576.3±112.4 <sup>c</sup>  | 679.87±35.85 <sup>bc</sup> | 798.3±111.7 <sup>ab</sup>  | 893.60±81.82 <sup>a</sup> | 655.5±119.7 <sup>bc</sup>  | 0.03       |

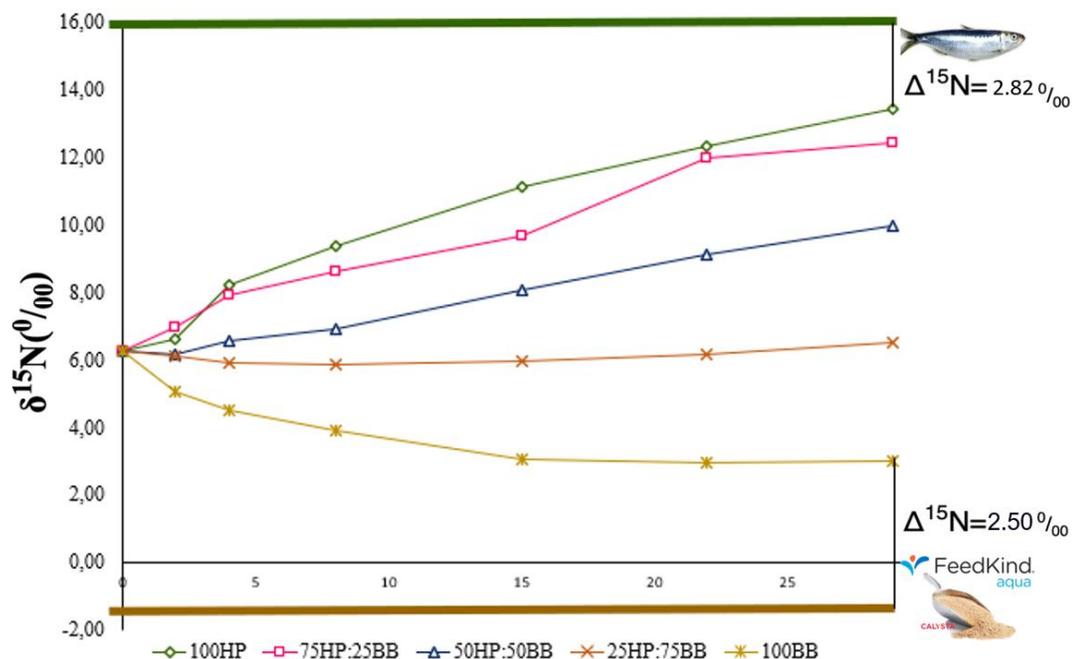
### 7.3 CAMBIOS ISOTOPICOS EN EL BIOENSAYO Y FACTORES DE DISCRIMINACIÓN

Previo al comienzo del experimento, el régimen alimenticio de adaptación registró valores isotópicos basales cercanos a  $\delta^{13}\text{C} = -23.90$  ‰ y  $\delta^{15}\text{N} = 6.27$  ‰ en el tejido muscular de los ejemplares de la *O. niloticus*. A lo largo del bioensayo, y tras la diferenciación de los tratamientos, se identificó un cambio exponencial en los valores isotópicos en el tejido muscular. Los valores de isotópicos de los ingredientes experimentales fueron muy

contrastantes:  $\delta^{15}\text{N}=16.47$  y  $\delta^{13}\text{C} =-18.01\%$  para HP, mientras que para la BB se registraron  $\delta^{15}\text{N} =-0.92$  y  $\delta^{13}\text{C}=-46.05$ , respectivamente- Tales valores facilitaron la estimación posterior de las contribuciones nutricionales aportadas por ambos ingredientes al crecimiento, la cual se realizó mediante un modelo de mezclado isotópico (Figura 25). Todas las dietas experimentales mostraron una rápida influencia en los valores isotópicos del tejido muscular de la tilapia desde el día 2 para valores  $\delta^{15}\text{N}$  y desde el día 4 para los valores  $\delta^{13}\text{C}$ . La mayoría de las dietas experimentales promovieron un equilibrio isotópico tanto para  $\delta^{15}\text{N}$  como para  $\delta^{13}\text{C}$  al final del experimento.

**Figura 25.** Valores de isótopos estables de carbono y nitrógeno (‰) en el músculo de tilapias que recibieron dietas experimentales basadas en harina de pescado (HP) con una sustitución de biomasa bacteriana (BB). Las curvas con comportamiento exponencial representan los promedios obtenidos del análisis de isótopos estables en músculo durante los diversos días de muestreo, y las líneas horizontales señalan los valores isotópicos asociados a los insumos utilizados.





Los valores  $\Delta^{15}\text{N}$  entre las tilapias y los ingredientes con mayor porción de HP fueron semejantes, a excepción de la dieta con 25HP:75BB donde se observa similitud con la firma isotópica con respecto a la dieta 100BB hasta el día 30.

#### 7.4 DIETAS EXPERIMENTALES Y SUS APORTES DE CARBONO Y NITRÓGENO EN TEJIDO MUSCULAR

En la Tabla 7 se presentan los resultados de las contribuciones de N aportadas por ambos ingredientes experimentales al tejido muscular, como resultado del consumo de dietas con diferentes proporciones de harina de pescado HP y BB. Se observa una diferencia significativa entre las contribuciones esperadas y las observadas. La mayor asimilación de N proveniente de la HP se registró en las dietas con proporciones 75HP:25BB y 50HP:50BB, mientras que la mayor contribución de BB se observó en la dieta con 25HP:75BB. Para el C (Tabla 8), la mayor asimilación en el tejido muscular no se observaron diferencias significativas en contribuidas y esperada, se observa en la dieta 75HP:25BB, tuvo una mayor contribución la HP. En la dieta 50HP:50BB, la asimilación fue equilibrada entre ambos ingredientes, mientras que en la dieta 75BB:25HP se registró una menor asimilación de HP en el músculo del organismo. Los resultados indican que, a mayor inclusión de BB en la dieta, se puede tener una mayor asimilación de N y C en el tejido muscular de la *O. niloticus*. Los resultados obtenidos con la dieta 50HP:50BB

permitieron comprobar que, al utilizar cantidades iguales de HP y BB, los peces mostraron una mayor asimilación de nutrientes en comparación con dietas dominadas por un solo ingrediente, lo que refuerza el beneficio de combinar ambos en proporciones balanceadas. Esto refuerza la idea de que una mayor cantidad de BB resulta en más nutrientes asimilados, y que la dieta balanceada 50:50 ofrece ventajas sobre el uso de un solo ingrediente.

**Tabla 7.** Asimilación proporcional de nitrógeno en músculo de tilapia alimentada con las dietas con diferentes proporciones de harina de pescado y biomasa bacteriana.

| Dieta     | Composición        | Nitrógeno en la dieta (%) | Intervalo de confianza mín. (%) | Nitrógeno asimilado en músculo (%) | Intervalo de confianza máx. (%) |
|-----------|--------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 75HP:25BB | Harina de pescado  | 75                        | 84                              | 90                                 | 96                              |
|           | Biomasa bacteriana | 25                        | 3                               | 10                                 | 15                              |
| 50HP:50BB | Harina de pescado  | 50                        | 62                              | 67                                 | 71                              |
|           | Biomasa bacteriana | 50                        | 28                              | 33                                 | 37                              |
| 25HP:75BB | Harina de pescado  | 25                        | 30                              | 34                                 | 36                              |
|           | Biomasa bacteriana | 75                        | 63                              | 66                                 | 69                              |

**Tabla 8.** Asimilación proporcional de carbono en músculo de tilapia alimentada con las dietas con diferentes proporciones de harina de pescado y biomasa bacteriana.

| Dieta     | Composición        | Nitrógeno en la dieta (%) | Intervalo de confianza mín. (%) | Nitrógeno asimilado en músculo (%) | Intervalo de confianza máx. (%) |
|-----------|--------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 75HP:25BB | Harina de pescado  | 75 <sup>a</sup>           | 84                              | 90 <sup>b</sup>                    | 96                              |
|           | Biomasa bacteriana | 25 <sup>a</sup>           | 3                               | 10 <sup>b</sup>                    | 15                              |
| 50HP:50BB | Harina de pescado  | 50 <sup>a</sup>           | 62                              | 67 <sup>b</sup>                    | 71                              |
|           | Biomasa bacteriana | 50 <sup>a</sup>           | 28                              | 33 <sup>b</sup>                    | 37                              |
| 25HP:75BB | Harina de pescado  | 25 <sup>a</sup>           | 30                              | 34 <sup>b</sup>                    | 36                              |
|           | Biomasa bacteriana | 75 <sup>a</sup>           | 63                              | 66 <sup>b</sup>                    | 69                              |

\*Los superíndices señalan diferencias estadísticamente significativas (según el test de Chi-cuadrado) entre los valores esperados en función de la dieta y los observados en el tejido, en cuanto a la contribución del nitrógeno proveniente de la biomasa microbiana.

## 7.5 TIEMPOS DE RESIDENCIA EN TEJIDO MUSCULAR (NITROGENO Y CARBONO)

Las tasas de recambio isotópico de C y N provocaron una modificación exponencial en el tejido muscular de las tilapias debido al consumo de las dietas experimentales. La ganancia porcentual de peso ( $k$ ) presentó valores elevados, variando entre 0.073 y 0.0786, con un cambio exponencial asociado a los valores isotópicos de los diferentes tratamientos. Durante el recambio metabólico ( $m$ ) de N en el músculo de la tilapia, se observó que entre los tratamientos existió un rango de variabilidad que va desde 0.015 a 0.121  $d^{-1}$  y en el caso de C presentó un rango de 0.06 a 0.03  $d^{-1}$ . En la Tabla 9 se observa que al considerar un 100% del cambio isotópico del N, este se atribuye principalmente al crecimiento ( $k$ ), con un 91%, mientras que el 9% restante corresponde al  $m$  en la dieta 100HP.

**Tabla 9.** Tasas de crecimiento ( $k$ ), tasa de recambio metabólico ( $m$ ) y tiempos medios de residencia ( $t_{50}$ ) de N y C en el tejido muscular de la *O. niloticus*, alimentadas con diferentes dietas formuladas con harina de pescado (HP) y biomasa bacteriana (BB).

| Tratamientos | $k$ ( $d^{-1}$ ) | $m$ ( $d^{-1}$ )* |                | $k$ vs $m$ (%) |     |         |     | $t_{50}$ (d)   |                | $r^2$          |                |
|--------------|------------------|-------------------|----------------|----------------|-----|---------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|
|              |                  | $\delta^{15}N$    | $\delta^{13}C$ | Nitrógeno      |     | Carbono |     | $\delta^{15}N$ | $\delta^{13}C$ | $\delta^{15}N$ | $\delta^{13}C$ |
|              |                  |                   |                | $k$            | $m$ | $k$     | $m$ |                |                |                |                |
| 100HP        | 0.0703           | 0.015             | 0.061          | 91             | 9   | 54      | 47  | 10             | 10             | 0.88           | 0.58           |
| 75HP:25BB    | 0.0735           | 0.005             | -              | 95             | 5   | -       | -   | 9              | -              | 0.87           | -              |
| 50HP:50BB    | 0.0758           | -                 | 0.16           | -              | -   | 32      | 68  | -              | 9              | 0.82           | 0.73           |
| 25HP:50BB    | 0.0786           | -                 | 0.073          | -              | -   | 51      | 49  | -              | 9              | -              | 0.80           |
| 100BB        | 0.0724           | .0121             | 0.036          | 98             | 2   | 66      | 34  | 10             | 10             | 0.90           | 0.95           |

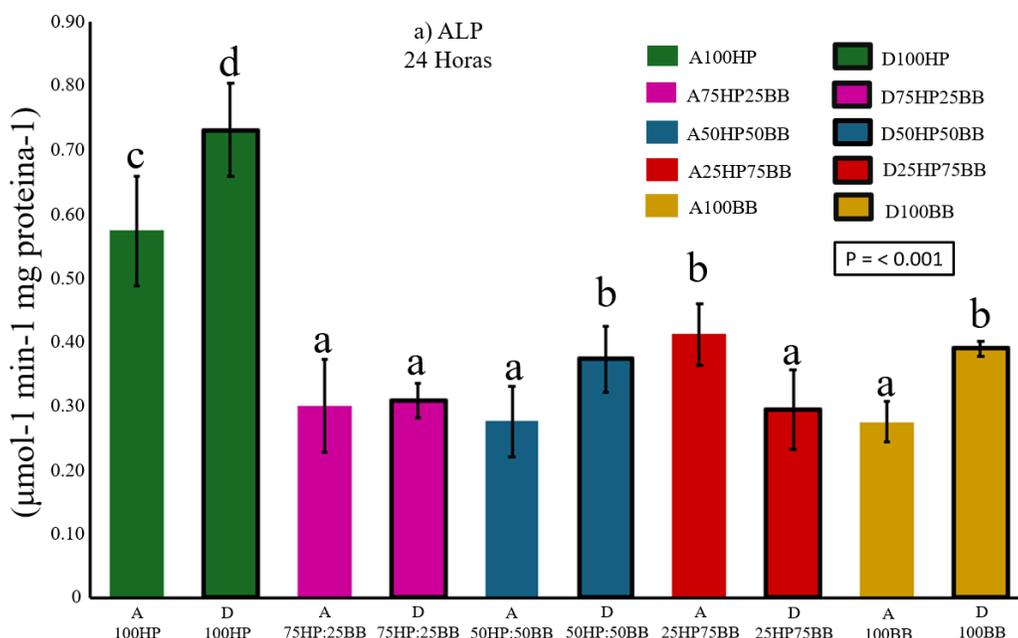
En las dietas con inclusión de BB, se observó que en la mayoría de los casos el cambio isotópico estuvo asociado principalmente al crecimiento ( $k$ ), en comparación con el  $m$ . En algunas dietas, el modelo de Heslein no reflejó esta tendencia de manera evidente; sin embargo, los valores obtenidos fueron comparables a los modelos de C. Para los isótopos

de C, se observa que el crecimiento también se atribuye principalmente al valor de k, con la excepción de la dieta 50HP:50BB.

Los valores obtenidos de ( $t_{50}$ ) es decir el tiempo medio de residencia del N en el tejido musculares estos valores oscilaron entre los 9 y 10 días de la misma forma en los valores  $t_{50}$  estimados para C.

## 7.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA DE LA ENZIMA ALP

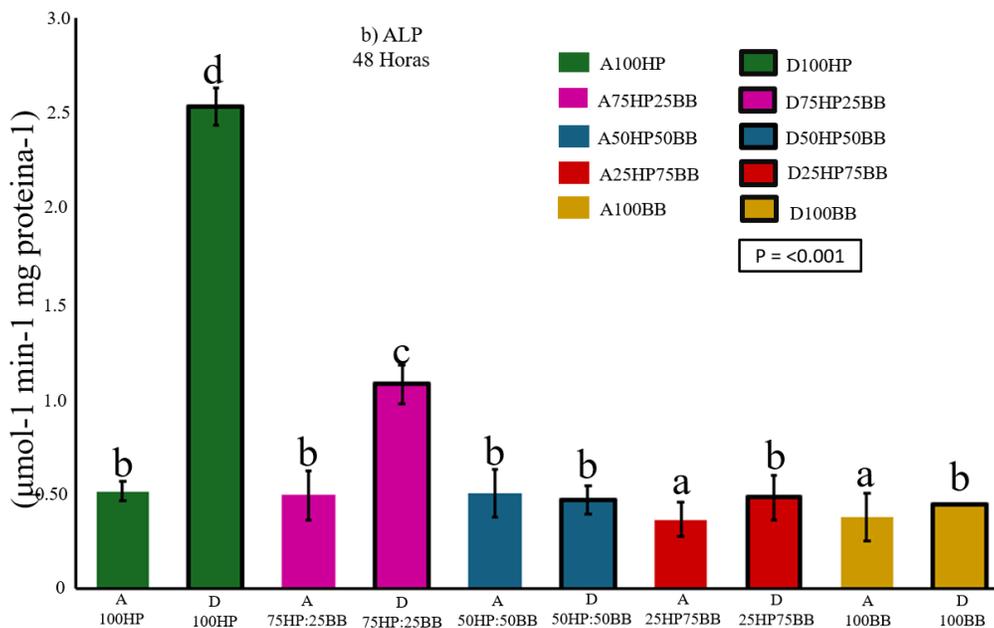
A las 24 horas (Figura 26), la actividad ALP en el grupo con aceite de pescado (A) mostró diferencias significativas ( $p=0.026$ ) en los tratamientos con inclusión de BB, con valores entre 0.28 y 0.41  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ , en comparación con la dieta A100HP (0.5732  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ ). Dentro de este grupo, la mayor actividad enzimática se observó en la dieta A100HP, seguida de la dieta A25HP:75BB (0.41  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ ). En contraste, las dietas A75HP:25BB, A50HP:50BB y A100BB registraron valores similares entre sí (0.30, 0.30 y 0.27  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ , respectivamente), que fueron menores ( $p=0.026$ ) a los tratamientos A100HP y A25HP:75BB.



**Figura 26.** Actividad promedio de ALP en muestras hepáticas tras 24 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ).

En los organismos sometidos a tratamientos con aceite de pescado y diésel (D), se observó un incremento en la actividad de la ALP a las 24 horas, siendo la dieta D100HP la que presentó la mayor actividad enzimática ( $0.7315 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ ). Este valor superó significativamente la respuesta de los organismos que consumieron dietas con inclusión de BB (Figura 26), con diferencias estadísticamente significativas en todos los casos ( $p < 0.001$ ). En los grupos con el tratamiento D cuyas dietas contenían alguna proporción de BB, se identificaron dos patrones de respuesta en la actividad de la enzima ALP. Las dietas D100BB y D50HP:50BB presentaron la mayor actividad, con valores de  $0.38$  y  $0.37 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente, mientras que las dietas D75HP:25BB y D25HP:75BB registraron valores de  $0.30$  y  $0.29 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

A las 48 horas (Figura 27), se observó una tendencia similar al primer muestreo, con una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) entre los tratamiento A y D. El tratamiento A100HP, no presentó diferencias significativas en comparación con los tratamientos con inclusión de HP y BB.



**Figura 27.** Actividad promedio de ALP en muestras hepáticas tras 48 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ).

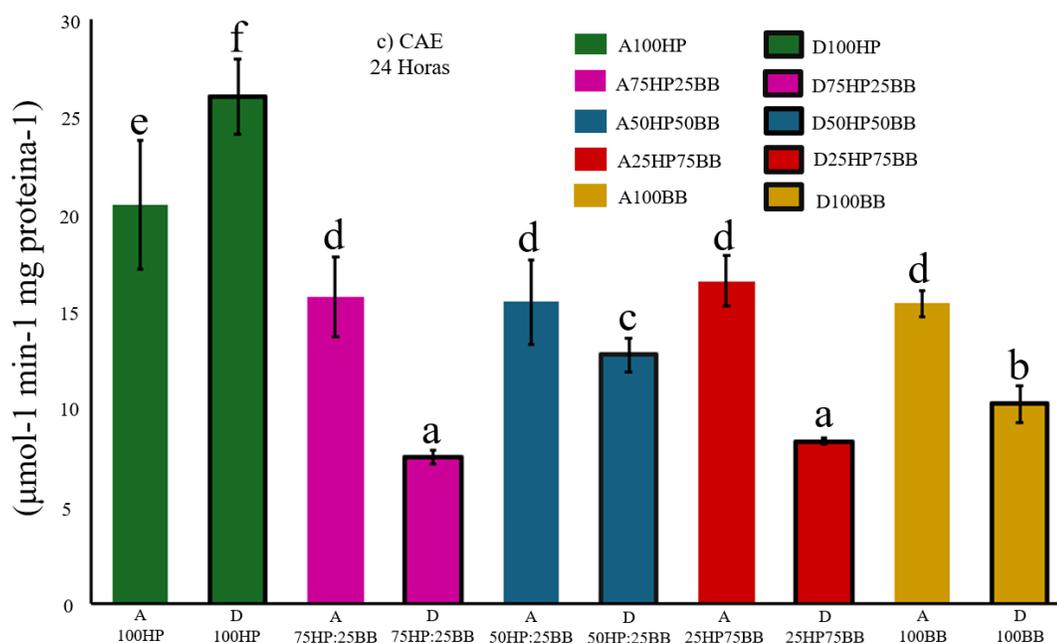
Dentro del período de muestreo de 48 horas, se identificaron dos grupos estadísticamente

distintos el grupo con mayor actividad enzimática incluyó las dietas A100HP, A50HP:50BB y A75HP:25BB, con valores de 0.51, 0.50 y 0.49  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente, mientras que el grupo con menor actividad estuvo conformado por los tratamientos A100BB y A25HP:75BB, con valores de 0.38 y 0.36  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

En los tratamientos con D a las 48 horas, se identificaron tres grupos estadísticamente distintos. La dieta D100HP presentó la mayor actividad enzimática más evidente perteneciente a los tratamientos con D (2.54  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), seguida de la dieta D75HP:25BB con un valor de 1.07  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . En contraste, las dietas D75HP:25BB, D50HP:50BB y D100BB mostraron valores de 0.48, 0.47 y 0.44  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

### 7.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA DE LA ENZIMA CAE

Los organismos del tratamiento A que recibieron la inclusión de BB en la dieta no mostraron diferencias significativas en la actividad de la CAE (Figura 28), registrando valores entre 15 y 16  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . En cambio, los organismos del tratamiento A100HP, presentaron una diferencia significativa, con una actividad de 20.5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

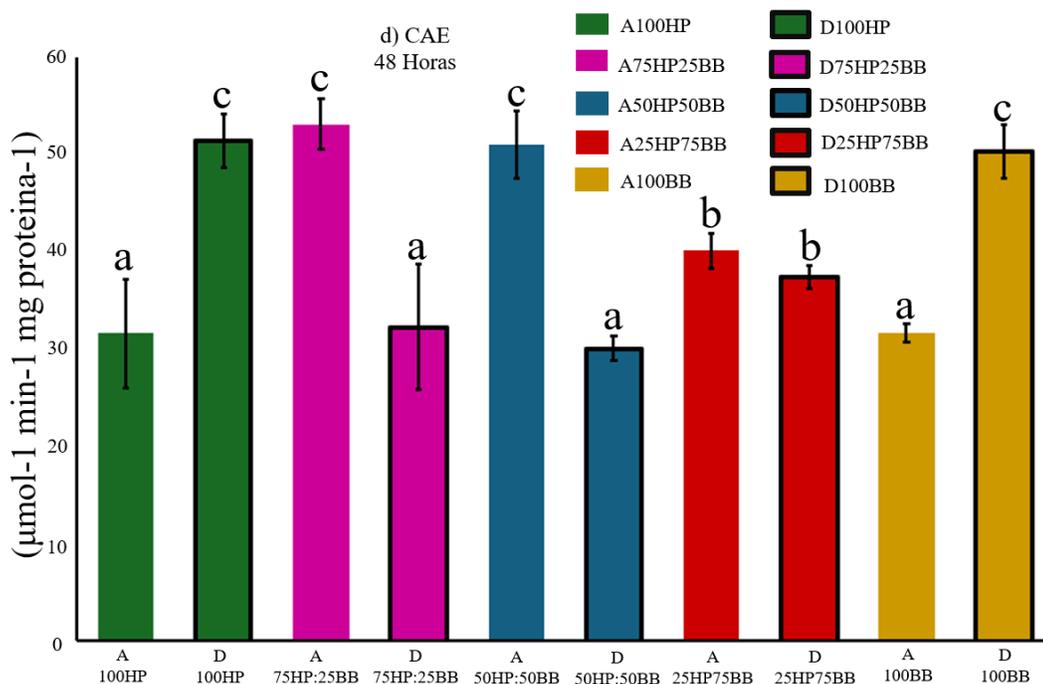


**Figura 28.** Actividad promedio de CAE en muestras hepáticas tras 24 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ).

Los tratamientos del grupo D mostraron diferencias significativas con respecto a los del grupo A. La mayor actividad se registró en el tratamiento D100HP (26.05  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), destacando sobre todos los demás.

Las dietas con BB presentaron la menor actividad, con 12.8 y 10.3  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  en las dietas 50HP:50BB y D100BB, respectivamente. Las concentraciones más bajas se observaron en la dieta D25HP:75BB (8.4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) y en la D75HP:25BB (7.5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), sin diferencias significativas entre ellas.

En las muestras de los peces con 48 horas de exposición, la actividad de la enzima CAE (Figura 29) en los grupos con el tratamiento A, presentaron diferencias significativas en tres aspectos importantes, las dietas A75HP:25BB y A50HP:50BB registraron la mayor actividad, con valores de 53.2 y 51.0  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente. En un rango similar, pero del tratamiento con D, se encontraron las dietas D100HP y D100BB, con un nivel de actividad del 51.5 y 50.3  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

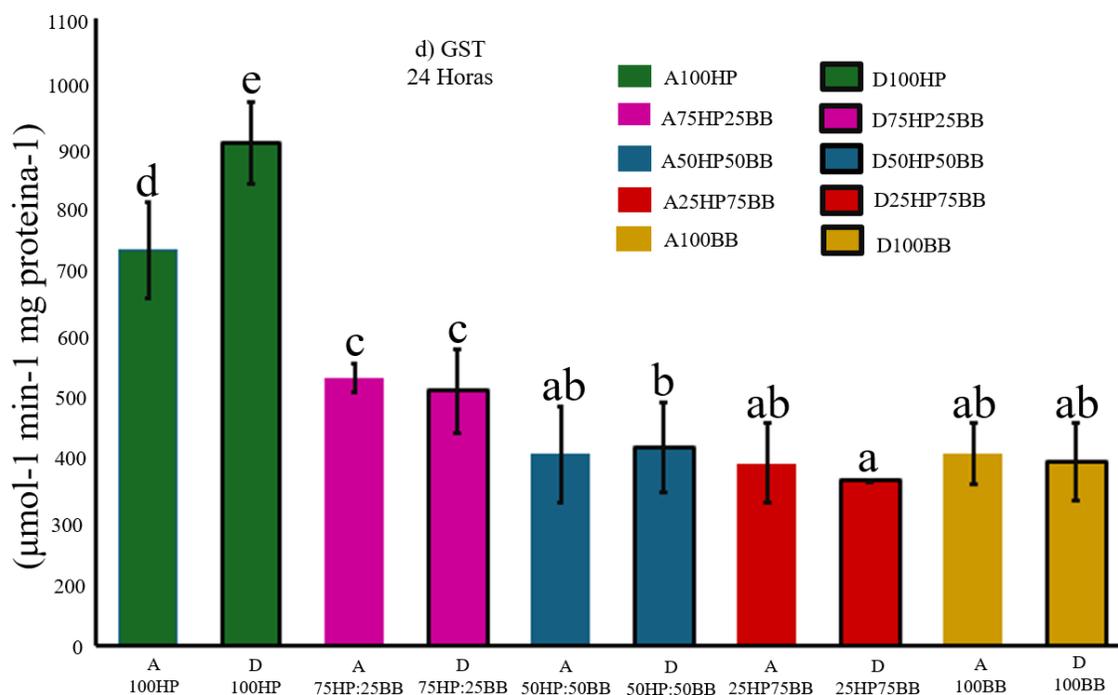


**Figura 29.** Actividad promedio de CAE en muestras hepáticas tras 48 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ).

Un caso destacable es la dieta 25HP:75BB, que no mostró diferencias significativas entre los tratamientos A y D, con valores de 40.1 y 37.4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Dentro de las concentraciones con menor actividad en el grupo A, los tratamientos A100HP y A100BB registraron valores de 31.7 y 31.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente. Con respecto al tratamiento D, las menores actividades se observaron en las dietas D75HP:25BB y D50HP:50BB, con 32.2 y 30.4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente.

### 7.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA DE LA ENZIMA GST

En la respuesta enzimática de la GST a las 24 horas (Figura 30), los resultados muestran un efecto escalonado entre los tratamientos. La mayor actividad enzimática se registró en el tratamiento D100HP (900  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), con una diferencia significativa respecto al tratamiento A100HP (730.5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ).

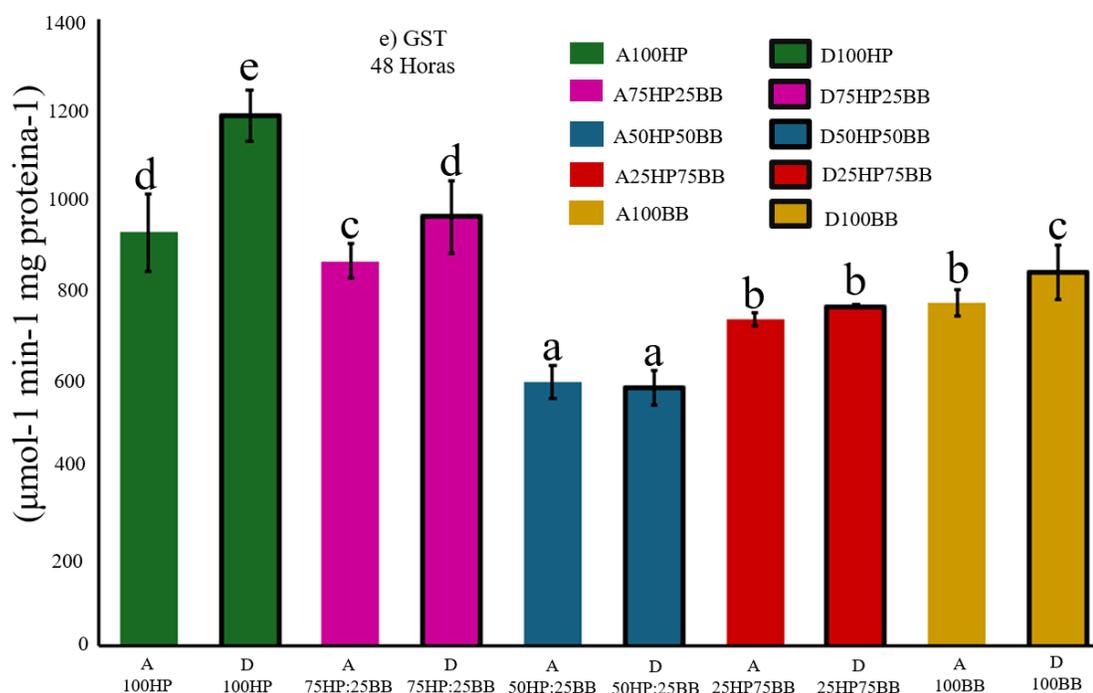


**Figura 30.** Actividad promedio de GST en muestras hepáticas tras 24 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ).

En el caso de la dieta 75HP:25BB, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos A y D. De manera similar, las dietas 50HP:50BB y 100BB tampoco

presentaron diferencias significativas entre sus respectivos tratamientos A y D. La menor actividad enzimática se observó en la dieta 25HP:75BB, donde los tratamientos A y D no mostraron diferencias significativas, con valores de 391.1 y 363.2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente.

A las 48 horas (Figura 31), la mayor actividad GST se registró en D100HP (1185  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), seguido, con una diferencia significativa, el tratamiento A100HP (924  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) y D75HP:25BB (960  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ). Posteriormente, se ubicaron A75HP:25BB y D100BB, con 860 y 834  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente. A100BB (766  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) presentó un nivel de actividad similar a la dieta 25HP:75BB, la cual registró valores similares entre A y D (760 y 730  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ). También, la dieta 50HP:50BB mostró valores sin diferencias significativas entre ambos tratamientos (590 y 577  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ).



**Figura 31.** Actividad promedio de GST en muestras hepáticas tras 48 horas de exposición a los distintos tratamientos, expresada en micromoles de producto generado por minuto por miligramo de proteína. Las letras minúsculas diferentes indican tratamientos con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.001$ ).

## 8. DISCUSIÓN

La acuicultura es una industria en constante crecimiento, este aumento responde a una creciente demanda global de pescados y mariscos. Además, en 2022, la producción total de acuicultura alcanzó los 94 Mt, superando por primera vez a la pesca de captura, que registró 91 Mt. (FAO, 2016, 2018). Este crecimiento resalta la necesidad de adoptar fuentes sostenibles y alternativas de nutrientes que permitan reducir o eliminar el uso de HP. En este contexto, la BB ha demostrado mejorar la calidad nutricional de los peces de cultivo, cuando se integra a la dieta (Sarker *et al.*, 2020; Gamboa-Delgado *et al.*, 2022; <sup>a</sup>Chen *et al.*, 2022).

Los estudios bromatológicos realizados al inicio del experimento determinaron que las dietas experimentales presentaron un aporte proteico que osciló entre el 43% y el 46%. Según el estudio de Choudhary *et al.* (2017), la tilapia juvenil requiere una dieta con un contenido de proteína entre el 32% y el 50%, mientras que, en ejemplares de mayor tamaño, esta necesidad disminuye a un rango del 25% al 30%, en concordancia con lo señalado por el NRC (2011).

En el presente ensayo, las unidades experimentales consistieron en peces con un peso promedio inicial de  $0.80 \pm 0.008$  gr, lo que corresponde a la etapa juvenil de la tilapia. En esta fase, el zooplancton, los detritos, los insectos, las macrófitas y el fitoplancton constituyen fuentes alimenticias fundamentales, especialmente en cuerpos de agua naturales, como lo señalan Tesfahun & Temesgen (2018). Lo anterior concuerda con Temesgen *et al.* (2022), quienes mencionan que la *O. niloticus*, al ser una especie omnívora, puede alimentarse de una amplia variedad de organismos, según su entorno, y su hábito alimenticio está determinado por la disponibilidad de recursos en su ambiente, lo que define sus elecciones y preferencias según sus nichos tróficos o áreas de forrajeo. No obstante, la falta de una recopilación exhaustiva sobre la dieta y los hábitos alimenticios de la tilapia en sus distintos entornos subraya la necesidad de más investigaciones para entender mejor su variabilidad biológica y alimentaria.

Los resultados generados en el presente estudio durante el periodo de los primeros 15 días de la prueba de alimentación sugieren que la sustitución parcial o total de HP por BB en

la dieta de los peces no afecta significativamente los parámetros de rendimiento ( $p > 0.05$ ). Al no observarse efectos negativos en los organismos que consumieron las dietas con BB, esto se atribuye a la presencia de dos grupos bacterianos importantes en la BB, *Bacillus* y *M. capsulatus*. Según Latif *et al.* (2023), a pesar del proceso industrial aplicado, o del estrés gastrointestinal, las bacterias del grupo *Bacillus* sobreviven en condiciones adversas, conservando sus propiedades nutricionales y mejorando la barrera intestinal, la adhesión de microorganismos favorables, la inmunomodulación y la síntesis de neurotransmisores para la absorción de nutrientes.

En cuanto a las bacterias metanotróficas, el estudio de Skrede *et al.* (1998) destacó el potencial de las bacterias como sustituto de la HP debido a sus excelentes características nutricionales, debido a su elevada concentración de proteínas y su aporte de aminoácidos esenciales, particularmente metionina y lisina, además de su alta digestibilidad. Este hallazgo se complementa con el estudio de <sup>b</sup>Chen *et al.* (2022), quienes reportaron que la BB contiene 1.90% de metionina y 4.20% de lisina, desempeñando un papel fundamental la salud intestinal y en la síntesis proteica en especies omnívoras como el camarón blanco, la *Litopenaeus vannamei*, influyó directamente en el crecimiento y desarrollo de la estructura muscular (Konnert *et al.*, 2022), lo que indica que la BB puede ser una alternativa viable para la sustitución de la HP en dietas acuícolas. Un caso contrario se reportó en el estudio de Velásquez *et al.* (2016), donde se evaluó el reemplazo de HP por *Arthrospira platensis* en la dieta de *O. niloticus*. A pesar de que esta biomasa contenía un 70% de proteína, se observó que a medida que aumentaba la sustitución de HP (>30%) el crecimiento de las tilapias se veía afectado negativamente.

Biswas *et al.* (2020) destacan la ausencia de una pared celular en *M. capsulatus*, lo que impide que actúe como barrera durante la digestión, facilitando así una mayor disponibilidad y absorción del ingrediente. Este aspecto es relevante, ya que la NRC (2011) señala que la composición de los alimentos influye significativamente en la disponibilidad y digestibilidad de los nutrientes, favoreciendo un mejor metabolismo y rendimiento en los peces. Este concepto también se refleja en el estudio de Agboola *et al.* (2019), en el que se menciona que ciertos alimentos de origen microbiano, como las microalgas *Scenedesmus sp.* y *Nannochloropsis gaditana*, poseen paredes celulares

rígidas, por lo que estas especies requieren tratamientos específicos, tales como pasteurización en frío, liofilización o congelación, para alterar su estructura celular y mejorar su digestibilidad, facilitando la absorción del contenido nutricional.

En el presente experimento, los organismos que consumieron la dieta 50HP:50BB registraron un desempeño superior en la mayoría de los parámetros a los 15 días, destacándose por un buen equilibrio en crecimiento final, CA y tasa de crecimiento, posicionándose como la opción más favorable entre las evaluadas. Esto puede deberse a las características previamente mencionadas de la tilapia, al ser una especie omnívora que se alimenta por filtración, tiene la capacidad de alimentarse de manera selectiva, tanto de origen animal, aunque principalmente de algas grandes, cianobacterias, diatomeas y fitoplancton (Figueredo *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2018).

Entre las dietas analizadas en esta investigación, la dieta 75HP:25BB se posicionó como el segundo mejor rendimiento en cuanto al peso durante el periodo de los 15 días. La inclusión del 75% de HP mostró resultados similares a los reportados por Yousif *et al.* (2019), quienes encontraron que una dieta con 75% de HP y 25% de *Ipomoea aquatica* en la alimentación de alevines de tilapia resultó en un peso promedio a los 14 días de  $11.67 \pm 0.55$  g, en comparación con los  $9.53 \pm 0.40$  g del grupo alimentado con 100% HP. Los resultados obtenidos en las primeras etapas de crecimiento del presente experimento sugieren que las dietas que combinan HP y BB son más efectivas para mejorar el crecimiento y la eficiencia alimentaria en tilapia del Nilo en comparación con las dietas que usan únicamente una sola fuente proteica.

Aunque los organismos alimentados con la dieta 100HP mostraron en el presente trabajo un desempeño aceptable, su rendimiento fue inferior en la mayoría de los parámetros analizados en los peces que consumieron BB. La dieta 100HP resultó ser la menos eficiente en términos de crecimiento, con una menor ganancia de biomasa ( $44.99 \pm 9.45$  g) y tasa de crecimiento ( $306.81 \pm 65$  g), con una CA menos eficiente ( $1.39 \pm 0.27$ ).

Para el día final, los resultados mostraron cambios significativos en comparación con los primeros 15 días del experimento. Durante este tiempo, los peces que consumieron la dieta 75HP:25BB quedaron por debajo de las dietas 50HP:50BB y 25HP:75BB. Esto puede

deberse a que los peces tienden a preferir una dieta basada en fitoplancton o macrófitas que la de origen animal (Tesfahun & Temesgen, 2018). Los organismos alimentados con la dieta 100HP mostraron un desempeño inferior en varios parámetros, como la ganancia de peso y la tasa de crecimiento, en comparación con las dietas que incluían BB. Sin embargo, esto no debería indicar que la dieta 100HP tuviera un efecto negativo en los organismos, ya que en un estudio realizado por Sharda *et al.* (2017) con tilapia del Nilo, una dieta con el 100% de HP permitió alcanzar un peso promedio de  $3.18 \pm 0.93$  g en 42 días, un valor similar al obtenido con la dieta 100HP en este estudio (3.36 g).

Los peces que consumieron la dieta 100BB, mostraron un rendimiento aceptable en el presente experimento, aunque su rendimiento resultó menor al de las dietas con combinación de HP y BB en términos de crecimiento y eficiencia alimentaria. El peso final ( $7.03 \pm 0.71$  g) y la ganancia de peso ( $6.22 \pm 0.71$  g) fueron menores en comparación con las observadas bajo el efecto de la dieta 25HP:75BB, lo que sugiere que una dieta basada al 100% de BB podría no ser tan efectiva como una combinación de ingredientes. Esto concuerda con los hallazgos de Simon *et al.* (2019), quienes evaluaron la inclusión de la harina Novacq™ (un ingrediente microbiano) en dietas con HP y harina de soya, con niveles del 5% y 10%. Sus resultados mostraron que la adición de una BB (Novacq™) promueve un mejor uso de los nutrientes y por lo tanto una mayor ganancia de peso final, en comparación con dietas formuladas únicamente con 100 % de HP o 100% harina de soya. Los organismos que consumieron las dietas con ambos ingredientes proteicos (75HP:25BB y 50HP:50BB) muestran un rendimiento intermedio, con resultados de peso individual (<8 g) y tasa de crecimiento (<800%), mejores que la dieta 100HP, pero inferiores a los que consumieron 75BB:25B. Esto demuestra que la inclusión de un ingrediente de origen alternativo en la dieta puede brindar mejores resultados. Así lo evidenciaron Suryaningrum y Samsudin (2020) en su estudio con la *O. niloticus*, donde observaron que la adición de un 10% de *Ulva lactuca* mejoró el factor de crecimiento. En su experimento, los peces alimentados con esta adición alcanzaron un peso significativamente mayor ( $24.04 \pm 0.22$  g) en comparación con aquellos que recibieron una dieta basada en un 100% de HP ( $21.52 \pm 0.54$  g).

La dieta 25HP:75BB se posicionó como la opción más favorable, logrando los mejores

resultados en ganancia de peso y consumo de alimento, junto con la más alta ( $p=0.003$ ) tasa de crecimiento de biomasa. Esto sugiere que, al avanzar la edad de los alevines, la dieta podría combinar una mayor proporción de BB, similar a lo mencionado por Badillo *et al.* (2014), al demostrar que la combinación de HP con harina de subproductos avícolas genera mejores tasas de crecimiento en la tilapia del Nilo, en comparación con dietas exclusivamente de HP.

Los resultados obtenidos en ambos días (día 15 y 30) muestran una tendencia similar a la reportada por Xu *et al.* (2021), donde la HP fue reemplazada por la misma BB del presente estudio (FeedKind®), sin mostrar efecto negativo en el crecimiento de una especie carnívora como *Acanthopagrus schlegelii*. Otro estudio similar, pero en el cual se investigó otra biomasa bacteriana, se presenta en la investigación de Yossa *et al.* (2021), en la cual se utilizó una levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (DY-Pro) en la dieta de la tilapia del Nilo. Los resultados indicaron que, no hubo un impacto negativo en el crecimiento de los peces, ni las medidas de longitud y peso del intestino, siendo una levadura eficiente para la formulación de dietas.

Otro aspecto clave a destacar en el experimento, previamente mencionado, es la especie utilizada en este estudio. La tilapia, al ser omnívora, esta fisiológicamente equipada con una amplia batería de enzimas digestivas, y por lo tanto se mostró una respuesta favorable al consumir las dietas conteniendo biomasa microbiana. No obstante, ofrecer una dieta basada en bacterias a una especie carnívora podría generar resultados diferentes, como se vio en el estudio de Zhang *et al.* (2022), quienes, al trabajar con lobina negra (*Micropterus salmoides*), registraron que una sustitución de ingredientes superior al 60% en la dieta afectó negativamente los parámetros de rendimiento en esta especie.

Un caso similar se observó en el estudio de Zheng *et al.* (2023), utilizando la BB en la especie carnívora rodaballo (*Scophthalmus maximus L.*). Los resultados demostraron que es posible sustituir solo un 30% de HP por una BB sin afectar el crecimiento de esta especie. Resultados similares se reportaron en las especies jurel (*Seriola quinqueradiata*) y en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), donde la sustitución de HP por BB es viable en un rango entre el 30% y el 80% (Kaushik & Luquet, 1980; Biswas *et al.*, 2020).

El estudio isotópico bajo condiciones controladas de alimentación permite rastrear las fuentes dietéticas de un organismo consumidor, reflejando en sus tejidos la ingesta a lo largo del tiempo y facilitando la identificación del equilibrio isotópico y las contribuciones de diferentes alimentos en el tejido muscular (Berezina *et al.*, 2024). El establecimiento de un equilibrio isotópico y la estimación de los factores de discriminación isotópica son aspectos requeridos por los modelos de mezclado para las posteriores estimaciones isotópicas de asimilación de nutrientes.

El equilibrio isotópico en el presente estudio se alcanzó, para la mayoría de las dietas en el día 15 para el C y en el día 22 para el N, siendo una concordancia con los hallazgos de Xochipa-Hernández (2023), aunque este tiempo puede variar según las condiciones experimentales, la edad, la especie estudiada, las condiciones ambientales y el tipo de alimentación (Herzka, 2005; Mohan *et al.*, 2016). En el estudio de Zhou & Gu (2020), realizado durante 56 días con la especie *O. niloticus*, los peces alcanzaron el equilibrio isotópico a los 35 días de alimentación con dietas basadas en HP y harina de soya.

En el presente estudio, se logró alcanzar el equilibrio isotópico en los organismos al mantener constantes las condiciones experimentales. Este resultado es consistente con lo observado por Binstock & Mohan (2023), quienes, al utilizar dietas con un contenido proteico del 44%, encontraron que el cambio isotópico se debía principalmente al crecimiento (k) y al metabolismo (m) de los organismos, lo que llevó a la sustitución de tejidos antiguos por materiales recién asimilados de la nueva dieta.

Al relacionar los resultados de los parámetros de rendimiento y la asimilación isotópica, es importante considerar la influencia de la microbiota intestinal, la cual está directamente vinculada con la digestión y aporte de nutrientes a la estructura de los tejidos musculares (Xiong *et al.*, 2019). No obstante, al no presentarse diferencias significativas entre los valores de C y N entre los valores de discriminación isotópica, esto se debe a la variabilidad de las vías metabólicas que toman los nutrientes que componen la dieta experimental y sus isótopos respectivos (Therrien *et al.*, 2011).

En el presente estudio se muestra (Figura 25) que el factor de discriminación isotópica ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) en la dieta 100HP fue de 2.82‰ y en el caso del  $\Delta^{13}\text{C}$  fue de 3.13‰, mientras que

para la BB fue de 2.50‰ en  $\Delta^{15}\text{N}$  y un valor relativamente alto de 10.3‰ en el  $\Delta^{13}\text{C}$  entre peces y la dieta 100BB, lo cual representa un resultado mayoritariamente favorable, respaldado por lo señalado en el estudio de Gaye-Siessengger *et al.* (2004), quienes afirmaron que valores de discriminación de  $\Delta^{15}\text{N}$  superiores al 3‰ indican que los organismos podrían estar consumiendo una dieta con deficiencia proteica. En el estudio de Gamboa-Delgado *et al.* (2016) utilizando biofloc en *Litopenaeus vannamei*, se reportó un factor de discriminación de 3.75‰ en  $\Delta^{15}\text{N}$ . Según Therrien *et al.*, (2011) este valor podría cambiar entre un 2.5 – 3.5 ‰ para el  $\Delta^{15}\text{N}$  y para el  $\Delta^{13}\text{C}$  0.4-1.0 ‰, dependiendo del nivel trófico. En el presente estudio, el factor de discriminación isotópica es fundamental para caracterizar la calidad de los ingredientes experimentales alternativos y analizar su aporte nutricional al organismo consumidor (Gamboa-Delgado & Le Vay, 2009; Barreto-Curiel *et al.*, 2018).

El resultado de 100HP puede estar relacionado con lo mencionado por Zhou & Gu (2020), debido a que la HP es una fuente proteica de impacto significativo en la vida media del recambio metabólico, debido a su alta digestibilidad, lo que permite una utilización eficiente de los nutrientes, mostrando una asimilación indicada por sus respectivos valores de isótopos. No obstante, el estudio de Zapata *et al.* (2016) evidenció que otras fuentes proteicas, como las harinas de subproductos avícolas, pueden ofrecer una asimilación y retención isotópica favorable gracias a su alta digestibilidad y su perfil balanceado de aminoácidos, superando en este aspecto a la HP. De manera similar, Fabrikov *et al.* (2021) destacaron que la asimilación de proteínas en dietas microbianas está directamente relacionada con la facilidad de digestión, por lo que las dietas combinadas en este estudio promovieron un mayor crecimiento gracias a un efecto sinérgico, donde se hipotetiza la biomasa favoreció a la microbiota intestinal y fortaleció las células epiteliales del intestino mejorando el proceso de digestión de la HP (Yukgehnaish *et al.*, 2020). Skrede *et al.* (1998), destacan que las proteínas microbianas con metionina y lisina, utilizadas en dietas para cerdos, aves y salmón, son una fuente eficiente de aminoácidos y N, con una digestibilidad del N del 79% al 84%. Sin embargo, sería necesario profundizar más en los procesos metabólicos, considerando la variabilidad de las vías metabólicas presentes en los tejidos musculares y hepáticos, que involucran tanto procesos anabólicos como catabólicos (Xia *et al.*, 2013; Dvergedal *et al.*, 2019). Un ejemplo de esto es la vía

metabólica utilizada para el aprovechamiento de los aminoácidos, la cual depende tanto de la ingesta de aminoácidos como de una síntesis endógena (O'Connell, 2017; Stephens *et al.*, 2023). El estrés, es otro factor que puede provocar una variación del equilibrio en el N y afectar la firma isotópica debido a procesos catabólicos (D'Ortenzio *et al.*, 2015; Drtikolova *et al.*, 2021).

En este estudio se observó que a mayor inclusión dietaria del ingrediente BB, mayor fue la asimilación del N dietario en el tejido muscular. En contraste, las dietas basadas en ingredientes de origen vegetal presentan una menor eficiencia de asimilación (relativa a la HP). En un estudio previo realizado en *Litopenaeus vannamei* (Martínez *et al.*, 2012), se indicó que las fuentes proteicas vegetales tienden a alterar los valores de  $\Delta^{15}\text{N}$  en los organismos acuáticos, indicando así posibles restricciones nutricionales.

Una consideración que también influyó en el resultado observando en las proporciones relativas de asimilación promovidas por ambos ingredientes, es la forma en que se usó el producto de la BB, cuyas partículas son de menor tamaño en comparación con las de la HP. Este aspecto es relevante en cuanto a la facilidad con la cual las enzimas digestivas pueden ejercer su efecto, y concuerda con lo analizado en los estudios de Caldini *et al.* (2015) y Gamboa-Delgado *et al.* (2016), en el cual los autores mencionan que la aportación de N dietario proveniente de una harina microbiana, como el 'biofloc', sugiere que este ingrediente, aunque seco, proporciona un aporte nutricional de fácil digestión y asimilación.

El cambio isotópico de N y C observado en *O. niloticus* fue analizado utilizando el modelo de Hesslein *et al.* (1993) descrito por Fry (2006). Este enfoque permitió calcular los valores de  $t_{50}$  y determinar la vida media del C y N en el tejido muscular de las tilapias (Barreto-Curiel *et al.*, 2018), obteniéndose tiempos medios de residencia de entre 9 y 10 días tanto para el N como para el C. En otras palabras, se requieren entre 9 y 10 días para la  $m$  de la mitad del C y N en el músculo de los peces al recibir estas dietas.

En el presente estudio se consideraron dos fuentes de proteína, atendiendo lo propuesto por Zapata *et al.* (2014). En dicho estudio se utilizó una mezcla isotópica con múltiples fuentes proteicas, que sirvió para estimar las fracciones de N retenidas y su equilibrio en

el tejido muscular, resaltando la utilidad de los isótopos estables para la evaluación nutricional, ya que valores más altos de  $\delta^{15}\text{N}$  suelen asociarse con ingredientes de origen animal, mientras que los ingredientes de origen vegetal y microbiano, al ocupar posiciones tróficas menores, tienden a mostrar menores valores  $\delta^{15}\text{N}$ , lo que permite evaluar con mayor precisión las contribuciones de diferentes fuentes de N al músculo de los peces (Gamboa-Delgado *et al.*, 2016).

Los valores de  $k$  y  $m$  estimados a partir del modelo de Hesslein *et al.* (1993) demostraron que el cambio isotópico observado en el tejido muscular de la *O. niloticus* se debió principalmente al incremento del desarrollo muscular ( $k$ ) y, con menor influencia, a las tasas de  $m$ . Un valor elevado de  $k$  sugiere una mayor eficiencia en la acumulación somática, una rotación proteica más eficiente y un menor gasto energético dedicado a funciones metabólicas (Barreto-Curiel *et al.*, 2018; García-Pérez *et al.*, 2022). Pacheco-Vega *et al.* (2018) indicando que, en especies como el camarón, las altas tasas de crecimiento favorecen el equilibrio isotópico a través de la acumulación de tejido nuevo, a diferencia del cambio metabólico.

En el presente experimento, se implementó el uso de tilapias en etapa de crecimiento, lo que facilitó un desarrollo acelerado y promovió tasas de recambio isotópico en periodos más cortos, influenciadas por su rápido crecimiento (Malek *et al.*, 2016). Este factor probablemente contribuyó de manera positiva a lograr un equilibrio isotópico en el tejido muscular, dado que ambos aspectos están estrechamente vinculados (Badillo *et al.*, 2014). Esta misma relación es respaldada por Skinner *et al.* (2016), quienes destacan que el recambio isotópico es impulsado principalmente por el crecimiento en la trucha *Oncorhynchus mykiss*, en lugar del  $m$ , especialmente en peces juveniles, donde hasta el 90% del recambio isotópico se asocia con esta etapa de crecimiento.

En el presente experimento, las dietas con HP tuvieron una eficiente incorporación en los tejidos musculares, lo cual es consistente con lo reportado por Badillo *et al.* (2014), quienes mediante SIA confirmaron que el uso de HP y harinas de subproductos avícolas en la dieta favorece una integración efectiva de nutrientes en el tejido muscular de la trucha arcoíris.

La investigación de Cai *et al.* (2018) demostró que, en el besugo (*Megalobrama amblycephala*), el uso de concentrado de proteína de arroz sin suplementación de lisina y metionina resulta en un menor crecimiento. Por otro lado, el estudio de Martínez-Córdova *et al.* (2003) realizado en *Litopenaeus vannamei* indicó que, incluso con dietas bajas en proteína, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  se incorporan eficazmente en la estructura muscular, favoreciendo su crecimiento. Ambos hallazgos sugieren que un crecimiento óptimo y un factor de discriminación isotópico bajo, están relacionados con la calidad de la proteína y la presencia de aminoácidos esenciales, como la metionina y la lisina, que con el contenido total de proteína en la dieta.

En la Tabla 8 se observa que no hubo diferencias significativas en las contribuciones de  $\delta^{13}\text{C}$  entre los valores esperados y los obtenidos, lo cual coincide con los resultados reportados por Xochipa-Hernández (2023) en relación con *Arthrospira platensis*. Sin embargo, las fuentes de carbono asimiladas a través de la dieta pueden experimentar un fenómeno conocido como enrutamiento isotópico, es decir, mostrar variaciones en comparación con otros tejidos que poseen distintos tipos de metabolismo, como las aletas, lo que refleja diferencias en la actividad metabólica y en el contenido de lípidos (Zhou *et al.*, 2014; Hayden *et al.*, 2017).

De manera complementaria al estudio de Xochipa-Hernández (2023), se observa que a medida que aumenta la sustitución de biomasa bacteriana (ProFloc™) por harina de pescado (HP), se presentan diferencias significativas en el aporte de  $\delta^{15}\text{N}$  al tejido muscular, como se muestra en la Tabla 9. Estos resultados coinciden con los del presente estudio, en el que se evidencia que al incrementar la proporción del ingrediente BB en la dieta, también se incrementa la asimilación de nutrientes en el tejido muscular. Resultados similares fueron reportados por Gamboa-Delgado *et al.* (2016), quienes observaron que la inclusión de biofloc en la dieta de *Litopenaeus vannamei* aumentaba su incorporación al tejido muscular conforme se incrementaba su sustitución por HP, hasta alcanzar un 50%.

En cuanto a las dietas con mayor concentración de HP (75HP:25BB y 50HP:50BB) se refleja que la HP tuvo una mayor presencia en el tejido muscular de los peces. Esto, en base al estudio de Zhou *et al.* (2014) señalan que la HP no solo se integra de manera eficiente en el tejido muscular contra una harina de soya, sino que el N suministrado

desempeña un papel significativo en el crecimiento, como se observó en juveniles de cobia (*Rachycentron canadum*). Martínez-Rocha *et al.* (2012), observaron un efecto distinto al comparar una dieta de origen vegetal a base de chícharo (*Pisum sativum*) en *Litopenaeus vannamei*. En una dieta de proporciones equivalentes (50:50), *P. sativum* tenía una incorporación del 60% de N en el tejido muscular.

Es importante destacar que las adiciones de ingredientes basados en microorganismos son importantes en la contribución al músculo, como las observadas en el estudio de Pacheco-Vega *et al.* (2018). En dicho estudio, la inclusión del 5% de biomasa de microalgas *Schizochytrium* y *Grammatophora* en una dieta para *Litopenaeus vannamei*, que contenía HP, resultó en un mayor crecimiento a diferencia de una inclusión del 100% de HP.

El estudio de biomarcadores enzimáticos tuvo como objetivo profundizar en los efectos de las dietas experimentales de la *O. niloticus*, evaluando la respuesta enzimática del hígado ante el consumo del ingrediente experimental (tratamiento con aceite “A”) y su reacción frente a un desafío con un xenobiótico (tratamiento con diésel “D”). La elección del hígado como órgano para el presente estudio, se basa en su función esencial como principal órgano de desintoxicación en peces y otros vertebrados. Este órgano refleja los efectos de la exposición prolongada a contaminantes, manifestándose en alteraciones en sus estructuras celulares y tejidos hepáticos (Minarik *et al.*, 2014; Topić *et al.*, 2023).

En el estudio de García *et al.* (2019), reportaron que la inclusión del ácido linoleico conjugado combinado con curcumina en la dieta de *O. niloticus* puede interferir en la biodisponibilidad de aflatoxina en el organismo (efecto hepatoprotector), dando evidencia que ciertos ingredientes pueden actuar como agentes absorbentes ante la presencia de contaminantes específicos. Con este hecho, en el presente estudio se realizó el análisis de las actividades de las enzimas ALP y GST (Dos Santos *et al.*, 2011). Las enzimas mencionadas, junto con la CAE, son consideradas biomarcadores hepáticos, debido a que su actividad refleja la respuesta del organismo ante condiciones adversas, sirviendo como indicadores de exposición a situaciones tóxicas tanto en entornos naturales como en la dieta (Bonifacio *et al.*, 2016).

Las respuestas enzimáticas de ALP, CAE y GST obtenidas en el presente estudio,

mostraron diferencias significativas entre los tratamientos A100HP (control) y D100HP. Estas diferencias pueden atribuirse a la exposición del xenobiótico administrado, como ocurrió en el grupo D, resultados similares a los estudios de Atli *et al.*, (2015) y Wu *et al.*, (2025). Las variaciones obtenidas de la actividad enzimática entre los grupos A y D son consistentes con los hallazgos de Cruz Valdez (2005) y Xochipa Hernández (2023), quienes emplearon esta técnica para obtener parámetros medibles y evaluar las respuestas enzimáticas tanto en el grupo control como la respuesta ante la presencia de un xenobiótico. De manera similar, Freitas *et al.* (2020) expusieron a un grupo de tilapias a aceites lubricantes (xenobióticos), observando alteraciones bioquímicas en la respuesta enzimática hepática, similares a las respuestas obtenidas en el grupo D y A y en las enzimas ALP y CAE (24 y 48 horas). Los resultados obtenidos respaldan que la aplicación de xenobióticos fue apropiada para validar el empleo de enzimas hepáticas como biomarcadores efectivos en la evaluación de las respuestas biológicas de organismos expuestos a contaminantes.

En las dietas con la sustitución de BB no se registraron efectos negativos sobre el organismo, lo cual sugiere que el consumo de la BB en la dieta no genera impactos negativos al organismo. Mahfouz & Sherif (2015), quienes observaron que, en la *O. niloticus* al brindar una dieta de mala calidad se induce una respuesta enzimática elevada de ALP, AST y GST.

En el grupo D la actividad de las enzimas ALP, CAE y GST de los organismos que consumieron dietas con BB, registraron una actividad menor o similar al grupo A, que podría estar relacionada con la diversidad bacteriana presente en las dietas con BB utilizada en este estudio. Uno de los grupos presentes en el ingrediente de la BB es la familia *bacillus*, los cuales destacan por su capacidad para degradar, transformar y desintoxicar una amplia gama de compuestos tóxicos (He *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2022), incluidos xenobióticos, herbicidas y pesticidas, mediante un potencial de biorremediación (Arora *et al.*, 2020). El uso en la dieta de estos microorganismos calificados como probióticos ha demostrado un mejor rendimiento de la tilapia incluso en estos entornos de alto estrés (Van-Doan *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Dehkohne *et al.* (2019), utilizando en ratas una dieta con la bacteria *Lacticaseibacillus*

*paracasei* TD3 ( $10^{10}$  UFC/ml) para el control del colesterol hepático, se demostró que el uso de dietas microbianas posee la capacidad de intervenir en la modulación sobre el citocromo P450 741A y HMGCR, que intervienen en la disminución de algunas enzimas, entre ellas la alanina aminotransferasa y la aspartato aminotransferasa, presentando una disminución en la presencia de algún daño hepático.

En el presente estudio, las dietas del grupo D que contenían BB, presentaron a las 24 y 48 horas una actividad de la ALP menor en comparación con el tratamiento D100HP. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Wu *et al.* (2022), quienes indujeron estrés oxidativo mediante la inyección intraperitoneal de un herbicida a ratas (Sprague-Dawley) alimentadas con *Bacillus* SC06 y SC08 (cultivo diluido a  $10^{-1}$  UFC /ml en solución salina al 0,9 %). En su estudio, observaron que el uso de estos microorganismos en la dieta es una alternativa para la prevención de lesiones hepáticas inducidas por estrés oxidativo, esto mediante la modulación de la microbiota intestinal, mejorado la capacidad antioxidante del hígado, obteniendo una disminución de los marcadores de daño oxidativo y el aumento de antioxidantes clave como SOD y T-AOC. En este mismo estudio, se evidenció una disminución en la actividad de enzimas como la ALP, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y lactato deshidrogenasa, lo que sugiere que la modulación de la microbiota intestinal podría ser una alternativa eficaz para prevenir enfermedades hepáticas.

Otro factor que influyó en la disminución de la actividad ALP, CAE y GST del grupo D, es la presencia de otro grupo de bacterias en la BB, específicamente *M. capsulatus*. Esto fue respaldado por el estudio de Chama *et al.* (2021), en el que se evaluaron parámetros hepáticos como la ALP en tilapias del Nilo alimentadas con la misma BB utilizada en el presente trabajo. Dicho estudio demostró que las dietas suplementadas con harina de proteína unicelular y BB (*M. capsulatus*) no provocaron alteraciones negativas en los niveles plasmáticos de ALP. Este estudio demostró que la BB puede contribuir a mejorar la respuesta inmune y la capacidad antioxidante, sin comprometer el crecimiento en tilapias juveniles. Los resultados obtenidos en el presente estudio en la ALP, indican que la BB compuesta por bacterias del grupo *Bacillus*, protege el hígado del estrés oxidativo mediante la regulación de la microbiota intestinal (Mingmongkolchai & Panbangred,

2018), sugiriendo que se debe considerar la función de la microbiota intestinal como parte del potencial de disminuir el estrés celular a nivel hepático (Nardone *et al.*, 2010).

La respuesta enzimática de CAE mostró un patrón similar tanto a las 24 horas (Figura 28) como a las 48 horas (Figura 29), indicando que la inclusión conjunta de los ingredientes HP y BB provoca una disminución en la actividad enzimática en la mayoría de las dietas del grupo D, en comparación con el grupo A. Esto sugiere una posible interacción entre ambos ingredientes que podría modular la respuesta enzimática del organismo. Sin embargo, es importante considerar lo señalado por Ribalta *et al.* (2015), quienes mencionan que las dietas experimentales, pueden inducir variaciones interespecíficas en la actividad plasmática de la CAE. Este planteamiento es respaldado por el estudio de Attademo *et al.* (2017), el cual indica que las variaciones en la actividad de la CAE pueden atribuirse a factores tanto intraespecíficos como interespecíficos, incluyendo la especie, el peso corporal, el sexo, la dieta e incluso la fuente lipídica (por ejemplo, aceite de pescado rico en omega-3). En relación con el uso de omega-3, es posible que este haya influido en la respuesta de la CAE. Glencross *et al.* (2024) señalan que los ácidos grasos omega-3 y omega-6 empleados en acuicultura tienen un efecto significativo sobre las funciones hepáticas asociadas a la desintoxicación. No obstante, en las Figuras 28 y 29, los tratamientos A100HP y D100HP no mostraron una disminución en la actividad de CAE, a diferencia de las dietas que contenían BB, lo cual podría descartar un efecto protector por parte de los omegas en las dietas experimentales. En cuanto a las variabilidades relacionadas con la especie, Nos *et al.* (2021) demostraron que, al exponer a cuatro especies de atunes a un pesticida organofosforado (dichlorvos) sin dieta experimental ni inhibidores específicos de CAE, se observaron diferencias notables. La especie *Auxis rochei* (melvera) presentó las actividades de CAE más altas, mientras que *Thunnus alalunga* (atún blanco) mostró las más bajas, sugiriendo esto que, incluso dentro de un mismo grupo taxonómico (familia *Scombridae*), la respuesta enzimática frente a un mismo contaminante puede ser altamente variable, evidenciando la influencia de factores genéticos y fisiológicos propios de cada especie.

Respecto a la actividad de la GST, en la Figura 30 se observa que no hay diferencias significativas en la actividad entre los grupos A y D con dietas que incluían BB, como en

los tratamientos A75HP:25BB y D75HP:25BB. A las 48 horas se mantuvo esta misma tendencia, mostrando un aumento, pero con una respuesta lineal y homogénea entre ambos grupos A y D, sin variaciones significativas entre las mismas dietas correspondientes. Esta tendencia se repite en todas las dietas con BB. Un resultado similar se reflejó en el estudio de García-Pérez *et al.* (2019), en el cual se observó una reducción en la actividad de GST en los grupos que recibieron suplementación con curcumina y ácido linoleico conjugado, lo que indica que estos tratamientos son efectivos para reducir dicha actividad. Una baja actividad de GST en los grupos D podría estar relacionada con la actividad presente de la CAE observada a las 24 horas, como señalan Ribalta *et al.* (2015), ya que la GST, al formar parte de la fase II de biotransformación hepática, depende de los metabolitos generados por las enzimas de fase I, como la CAE (Costa *et al.*, 2011; Allocati *et al.* 2018).

Con respecto a la BB utilizada en este estudio, la evidente disminución en las tres enzimas puede deberse a lo reportado por Avdeeva & Gvozdev (2017), en el sentido que la bacteria *Methylococcus capsulatus* posee una notable capacidad para participar en bioconversión, biosorción, bioacumulación y bioremediación, destacándose por activar el enlace C-H del metano, utilizando C como fuente de energía. Dentro del mismo estudio se destaca que *Methylosinus trichosporium* (bacteria metanotrófica) es capaz de oxidar compuestos tóxicos, incluidos los hidrocarburos, por lo que es importante continuar con el estudio de estas bacterias. Chandra *et al.* (2020) estudiaron el efecto de varios microorganismos con la capacidad de actuar como compuestos bioactivos, destacando su habilidad para producir metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes. Un estudio complementario es el de Dindar *et al.* (2019), en el cual hace mención que existen las bases sobre bacterias, como *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Arthrobacter denitrificans*, las cuales en un desafío contra el diésel ayudan a la degradación de compuestos contaminantes, debido a que favorecen la bioremediación, un proceso en el cual estas bacterias descomponen los hidrocarburos presentes en el diésel, convirtiéndolos en compuestos menos tóxicos y más fácilmente asimilables por las plantas, además de ayudar a mejorar el crecimiento de las plantas, como se observó en las variedades de *Zea mays* (704 y 640), donde se registraron aumentos significativos en el contenido de carbohidratos y en la actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa, en presencia de estas bacterias. Sin embargo, es necesario profundizar en la investigación sobre la diversidad

microbiana y los efectos bioactivos de estos metabolitos, con el fin de evaluar su potencial aplicación como antioxidantes naturales (Singh *et al.*, 2019).

Cabe destacar que el uso de una especie omnívora, como la tilapia del Nilo, influye significativamente en la respuesta enzimática. Esto contrasta con lo reportado por Zheng *et al.* (2023) en rodaballo, una especie carnívora, donde una sustitución del 80% de la BB tuvo efectos negativos sobre la digestibilidad de los nutrientes, redujo la capacidad antioxidante, incrementó la actividad de la superóxido dismutasa y malondialdehído, y comprometió la salud hepática al elevar los niveles de transaminasa glutámico-oxalacética. Por lo tanto, la interacción entre la dieta y las características fisiológicas del organismo consumidor es determinante para la expresión enzimática a nivel hepático.

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que el uso de la BB no afectó de manera negativa la especie *O. niloticus* durante las primeras etapas de crecimiento. Los parámetros de rendimiento fueron favorables y consistentemente se observó una respuesta similar por ambos ingredientes al considerarlos como única fuente proteica.

Los tratamientos evaluados, indican que las dietas experimentales que proporcionaron ambos ingredientes brindan un equilibrio nutricional adecuado para el desarrollo de los peces.

La incorporación de la BB a una dieta con HP para tilapia genera una mayor sinergia en ambos ingredientes lo que promueve la disponibilidad y digestibilidad de la asimilación de nutrientes, sin afectar de manera negativa el crecimiento.

La BB se podría considerar en un futuro como una alternativa palatable, y como un ingrediente que no afecta significativamente la CA, ni la S, lo cual podría reducir la demanda y el consumo excesivo de la HP.

Aunque la dieta HP se destaca por su aporte proteico y su variabilidad en aminoácidos, los niveles altos de BB lograron contribuir al suministro de C y N estructural necesario para la formación de tejido muscular en la tilapia.

Se comprobó que los valores isotópicos  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en los peces al inicio del bioensayo se mantuvieron en un valor basal. Con el transcurso del bioensayo de alimentación, se observó un cambio isotópico rápido, el cual se estabilizó una vez alcanzado el equilibrio (días 15 y 22 del experimento). Esto permitió estimar el factor de discriminación, facilitando a su vez la aplicación de correcciones durante la determinación de las contribuciones de N y C al tejido muscular por parte de las dietas experimentales. Además, se evidenció que, a mayor inclusión del ingrediente BB, mayor fue su aporte al crecimiento y a la composición del tejido muscular.

En línea con estos resultados, las dietas experimentales mostraron tasas de crecimiento ( $k$ ) favorables y un menor  $m$  aportando al cambio isotópico, lo que derivó en tiempos medios

de residencia (t50) en tejido muscular de 9 a 10 d. Este comportamiento puede atribuirse a la calidad de los ingredientes los cuales facilitaron una mejor incorporación de nutrientes en los tejidos musculares.

La inclusión parcial o total de la BB, derivó en una disminución de actividad de ALP en los organismos expuestos a diésel. La enzima CAE mostró la mayor variabilidad, lo que refleja la respuesta inicial de esta enzima de fase I frente a la exposición al diésel. Los peces alimentados con BB mostraron menor actividad de la enzima GST, posiblemente debido a un efecto osmoprotector del ingrediente.

Los hallazgos del presente trabajo resaltan la importancia de seguir investigando para optimizar el uso de estos ingredientes alternativos de origen microbiano en la dieta de la tilapia.

## 10 PERSPECTIVA

- Las dietas adecuadas que incluyen la sustitución o adición de biomasa microbiana podrían beneficiar el crecimiento y la supervivencia de los peces en etapa juvenil.
- Esta adición tiene un efecto sinérgico, favoreciendo una mayor digestibilidad y asimilación de la HP en peces juveniles cuando se utiliza en mayores proporciones.
- La presencia de la BB en la dieta contribuyó al aporte de N y C estructural al tejido muscular de la tilapia.
- Una mayor disponibilidad del ingrediente BB en la formulación de las dietas se asocia con una mayor asimilación, una mayor contribución al tejido muscular, así como con un incremento en el crecimiento muscular y un efecto protector a nivel hepático.
- La BB podría convertirse en una alternativa prometedora para sustituir la HP en especies omnívoras, como la tilapia del Nilo, ofreciendo beneficios tanto en calidad nutricional como en reducción de costos.
- Es fundamental profundizar en los efectos hepatoprotectores de la BB, considerando la diversidad de microorganismos presentes en su formulación, especialmente en estudios enfocados en los mecanismos fisiológicos asociados a la flora intestinal de los peces.

## 10. REFERENCIAS

- Abwao, J., Jung'a, J., Barasa, J. E., Kyule, D., Opiyo, M., Awuor, J. F., Ogello, E.m Munguti, J. M., and Keya, GA. (2021). Selective breeding of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: a strategy for increased genetic diversity and sustainable development of aquaculture in Kenya. *Journal of Applied Aquaculture*, 35(2), 237-256. <https://doi.org/10.1080/10454438.2021.1958728>
- Agboola, J. O., Teuling, E., Wierenga, P. A., Gruppen, H., and Schrama, J. W. (2019). Cell wall disruption: an effective strategy to improve the nutritive quality of microalgae in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture nutrition*, 25(4), 783-797. <https://doi.org/10.1111/anu.12896>
- Aguilera, C., Cruz, J., & Mendoza, R. (2015). Physiological response of alligator gar juveniles (*Atractosteus spatula*) exposed to sub-lethal doses of pollutants. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 1015–1027. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0066-5> <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0978-0>
- Aguilera, C., Del Pliego, P. G., Alfaro, R. M., Lazcano, D., and Cruz, J. (2012). Pollution biomarkers in the spiny lizard (*Sceloporus spp.*) from two suburban populations of Monterrey, Mexico. *Ecotoxicology*, 21, 2103-2112. DOI 10.1007/s10646-012-0978-0
- Ahmed, M., Liang, H., Chisomo Kasiya, H., Ji, K., Ge, X., Ren, M., and Sun, A. (2019). Complete replacement of fish meal by plant protein ingredients with dietary essential amino acids supplementation for juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture Nutrition*, 25(1), 205-214. <https://doi.org/10.1111/anu.12844>
- Albrektsen, S., Kortet, R., Skov, P. V., Ytteborg, E., Gitlesen, S., Kleinegris, D., Mydland, L. T., Hansen, J. Ø., Lock, E. J., Mørkøre, T., James, P., Wang, X., Whitaker, R. D., Vang, B., Hatlen, B., Daneshvar, E., Bhatnagar, A., Jensen, L. B., and Overland, M. (2022). Future feed resources in sustainable salmonid production: A review. *Reviews in Aquaculture*. 14(4), 1790–1812. <https://doi.org/10.1111/raq.12673>

- Alcántar-Vázquez, J. P. (2018). Sex proportion in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed estrogen mixtures: a case of paradoxical masculinization. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *46*(2), 337-345. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue2-fulltext-9>
- Alder, J., Campbell, B., Karpouzi, V., Kaschner, K., and Pauly, D. (2008). Forage fish: From ecosystems to markets. *Annual Review of Environment and Resources*, *33*, 153–166. <https://doi.org/10.1146/annurev.enviro.33.020807.143204>
- Aliabad, H. S., Naji, A., Mortezaei, S. R. S., Sourinejad, I., and Akbarzadeh, A. (2022). Effects of restricted feeding levels and stocking densities on water quality, growth performance, body composition and mucosal innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry in a biofloc system. *Aquaculture*, *546*, 737320. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737320>
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Federici, L. (2018). Glutathione transferases: Substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, *7*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
- Amin, M., Flowers, T., Bank, Z., & Khanewal, P. (2004). Evaluation of Kjeldahl digestion method. *Journal of Research (Science)*, *15*(2), 159-179.
- Antonio-Estrada, C., Cruz-Domínguez, E., Martínez-López, M., Matías-Pérez, D., and García-Montalvo, I. A. (2024). *Oreochromis niloticus* is a blue economy alternative for the Papaloapan region of the state of Oaxaca, Mexico. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *8*, 1322838. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1322838>
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Aragão, C., Gonçalves, A. T., Costas, B., Azeredo, R., Xavier, M. J., and Engrola, S. (2022). Alternative proteins for fish diets: implications beyond growth. *Animals*, *12*(9), 1211. <https://doi.org/10.3390/ani12091211>
- Arora, P. K. (2020). Bacilli-mediated degradation of xenobiotic compounds and heavy metals. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 570307.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570307>

- Atli, G., Yuzbasioglu Ariyurek, S., Kanak, E. G., and Canli, M. (2015). Alterations in the serum biomarkers belonging to different metabolic systems of fish (*Oreochromis niloticus*) after Cd and Pb exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *40*(2), 508-515. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.001>
- Attademo, A. M., Sanchez-Hernandez, J. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., & Junges, C. (2017). Effect of diet on carboxylesterase activity of tadpoles (*Rhinella arenarum*) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *135*, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.012>
- Avdeeva, L., & Gvozdev, R. (2017). Effect of copper concentration on the growth of *Methylococcus capsulatus* (Strain M). *Chemistry Journal of Moldova*, 110-114. <http://dx.doi.org/10.19261/cjm.2017.404>
- Ayadi, F., Rosentrater, K. A., and Muthukumarappan, K. (2010). A review of alternative protein sources in aquaculture feeds. ASABE Annual International Meeting, Pittsburgh.
- Azevedo, R. V. D., Fosse Filho, J. C., Cardoso, L. D., Mattos, D. D. C., Vidal Júnior, M. V., and Andrade, D. R. D. (2015). Economic evaluation of prebiotics, probiotics and symbiotics in juvenile Nile tilapia. *Revista Ciência Agronômica*, *46*, 72-79. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902015000100009>
- Badillo Zapata, D., & Viana, M. T. (2015). Isótopos estables ( $\delta^{15}\text{N}$ ) como herramienta para medir la calidad de alimentos comerciales para lobina rayada (*Morone saxatilis*) en jaulas marinas. *Hidrobiológica*, *25*(2), 303–306. <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/488>
- Badillo, D., Herzka, S. Z., and Viana, M. T. (2014). Protein retention assessment of four levels of poultry by-product substitution of fishmeal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets using stable isotopes of nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) as natural tracers. *PLoS One*, *9*(9), e107523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107523>

- 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>
- Barriga-Vallejo, C., Aguilera, C., Cruz, J., Banda-Leal, J., Lazcano, D., & Mendoza, R. (2017). Ecotoxicological biomarkers in multiple tissues of the neotenic *Ambystoma spp.* for a non-lethal monitoring of contaminant exposure in wildlife and captive populations. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3590-3>
- Bavia, L., Santiesteban-Lores, L. E., Carneiro, M. C., and Prodocimo, M. M. (2022). Advances in the complement system of a teleost fish, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 123, 61-74. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.02.013>
- Berezina, N. A., Terentjev, P. M., Zubova, E. M., Tsurikov, S. M., Maximov, A. A., and Sharov, A. N. (2024). Seasonal Diet Changes and Trophic Links of Cold-Water Fish (*Coregonus albula*) within a Northern Lake Ecosystem. *Animals*, 14(3), 394. <https://doi.org/10.3390/ani14030394>
- Betanzos-Torres, EA, Marin-Muñiz, JL, Piñar-Álvarez, MA, Celdrán-Sabater, D. & Mata-Alejandro, H. (2019). Análisis de la aplicación de la tecnología biofloc en la producción de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en regiones rurales de México. *Rinderesu* 4, 42–58.
- Binstock, A. L., Fox, A. S., and Mohan, J. A. (2023). Isotopic turnover and fractionation of  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in captive *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Fishes*, 8(9), 469. <https://doi.org/10.3390/fishes8090469>
- Biswas, A., Takakuwa, F., Yamada, S., Matsuda, A., Saville, R. M., LeBlanc, A., Silverman, J. A., Sato, N., and Tanaka, H. (2020). Methanotroph (*Methylococcus capsulatus, Bath*) bacteria meal as an alternative protein source for Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 529, 735700. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735700>

- Biswas, C., Hossain, M. M. M., Sarker, B., Billah, M. M., and Ali, M. A. (2018). Culture strategies, diseases and their mitigations in mono-sex Nile tilapia farming in Jessore sadar region, Bangladesh. *Asian-Australasian Journal of Bioscience and Biotechnology*, 3(3), 190-200. <https://doi.org/10.3329/aajbb.v3i3.64823>
- Boecklen, W. J., Yarnes, C. T., Cook, B. A., and James, A. C. (2011). On the use of stable isotopes in trophic ecology. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 42(1), 411-440. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144726>
- Bonifacio, A. F., Cazenave, J., Bacchetta, C., Ballesteros, M. L., de los Ángeles Bistoni, M., Amé, M. V., Bertrand, L., and Hued, A. C. (2016). Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecological Indicators*, 67, 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.011>
- 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)
- Brodeur, J. C., Suarez, R. P., Natale, G. S., Ronco, A. E., and Zaccagnini, M. E. (2011). Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1370–1380. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.024>.
- Bruslé, J., & i Anadon, G. G. (2017). The structure and function of fish liver. In *Fish morphology* (pp. 77-93).
- Buchheister, A., & Latour, R. J. (2010). Turnover and fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in tissues of a migratory coastal predator, summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67(3), 445-461. <https://doi.org/10.1139/F09-196>
- Burma, S. (2018). Egypt's success and Africa's failure-how to explain different

development trajectories in (tilapia) aquaculture. A case study of the (tilapia) aquaculture industry development in Africa (Master's thesis, UiT The Arctic University of Norway).

Cai, W. C., Liu, W. B., Jiang, G. Z., Wang, K. Z., Sun, C. X., and Li, X. F. (2018). Lysine supplement benefits the growth performance, protein synthesis, and muscle development of *Megalobrama amblycephala* fed diets with fish meal replaced by rice protein concentrate. *Fish physiology and biochemistry*, 44, 1159-1174. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0503-3>

Caldini, N. N., Cavalcante, D. D. H., Rocha Filho, P. R. N., and Sá, M. V. D. C. (2015). Alimentação da tilápia do Nilo com dietas artificiais e biomassa seca de bioflocos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37, 335-341. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v37i4.27043>

Cao, L., Naylor, R., Henriksson, P., Leadbitter, D., Metian, M., Troell, M., and Zhang, W. (2015). China's aquaculture and the world's wild fisheries. *Science*, 347(6218), 133–135. <https://doi.org/10.1126/science.1260149>

Carrasco, T. S., Botta, S., Machado, R., Colares, E. P., and Secchi, E. R. (2018). Effects of acidification on the isotopic ratios of Neotropical otter tooth dentin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(10), 784-788. <https://doi.org/10.1002/rcm.8097>

Cavalcante, RB, Telli, G. S., Tachibana, L., Dias, D. d. C., Oshiro, E., Natori, M. M., and Ranzani-Paiva, MJT (2020). Probiotics, prebiotics and synbiotics for Nile tilapia: growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture Reports*, 17, 100343. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100343>

Chama, M. K. H., Liang, H., Huang, D., Ge, X., Ren, M., Zhang, L., Wu, L., and Ke, J. (2021). Methanotroph (*Methylococcus capsulatus*, Bath) as an alternative protein source for genetically improved farmed tilapia (GIFT: *Oreochromis niloticus*) and its effect on antioxidants and immune response. *Aquaculture Reports*, 21, 100872. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100872>

- Chandra, P., Sharma, R. K., and Arora, D. S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Research International*, 129, 108849. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108849>
- Che, J., Ye, S., Liu, B., Yu, D., Chen, Q., Ge, C., Liu, G., and Wang, J. (2016). Effects of *Brevibacillus brevis* FJAT-1501-BPA on growth performance, faecal microflora, faecal enzyme activities and blood parameters of weaned piglets. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(12), 1545-1553. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0756-8>
- <sup>a</sup>Chen, K., Sagada, G., Xu, B., Liu, Y., Zheng, L., Tegomo, A.F., Yang, Y., Sun, Y., Wang, J., Longshaw, M., and Shao, Q. (2022). Evaluation of methanotrophic bacteria meal (*Methylococcus capsulatus*, Bath) as an alternative protein source for growth performance, digestive enzymes, and health status of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture International*, 30(4), 1693-1710. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00869-9>
- <sup>b</sup>Chen, Y., Wang, W., Li, E., Wang, Q., and Shao, Q. (2022). Appraisal of dietary methanotroph bacteria meal replacing fishmeal on growth, feed utilization, serum biochemical parameters, antioxidant status, and digestive enzyme activities of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture International*, 30, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00747-7>
- Cheng, Z. J., & Hardy, R. W. (2007). Apparent digestibility coefficients of nutrients and nutritional value of poultry by-product meals for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* measured in vivo using settlement. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(4), 458-465. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2002.tb00025.x>
- 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.
- Choudhary, H. R., Sharma, B. K., Uppadhyay, B., & Sharma, S. K. (2017). Effect of different protein levels on growth and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(3), 480-484.

- Cioni, C., Francia, N., Greco, A., De Vito, L., Bordieri, L., and Crosetti, D. (2000). Development of the caudal neurosecretory system of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Journal of Morphology*, 243(2), 209-218. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(200002\)243:2<209::AID-JMOR9>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(200002)243:2<209::AID-JMOR9>3.0.CO;2-J)
- CONAPESCA (2018). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2018. Inf. téc. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.
- CONAPESCA (2023). La CONAPESCA, en el marco del Día Mundial de la Acuicultura que se celebra cada 30 de noviembre, informó que de acuerdo a cifras preliminares con corte al 8 de noviembre de 2023, la producción acuícola este año supera las 197 mil toneladas. México. <https://www.gob.mx/conapesca/prensa/coloca-gobierno-de-mexico-a-la-acuicultura-mexicana-en-posicion-prioritaria-y-estrategica>
- Conde-Sieira, M., Chivite, M., Míguez, J. M., & Soengas, J. L. (2018). Stress effects on the mechanisms regulating appetite in teleost fish. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 631.. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00631>
- Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social CONEVAL. (2022). Medición Multidimensional de la Pobreza. [https://www.coneval.org.mx/Medicion/MP/Documents/MMP\\_2018\\_2020/Pobreza\\_multidimensional\\_2016\\_2020\\_CONEVAL.pdf](https://www.coneval.org.mx/Medicion/MP/Documents/MMP_2018_2020/Pobreza_multidimensional_2016_2020_CONEVAL.pdf)
- Costa, J., Ferreira, M., Rey-Salgueiro, L., and Reis-Henriques, M. A. (2011). Comparison 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-Saurez L. E., Nieto-Lopez M., Guajardo-Barbosa C., Tapia-Salazar M, Scholz U and Ricqui-Marie D. (2007). Replacement of fishmeal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei* and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture* 272, 466-476. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.084>

- 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
- Daniel, H. B. T., dos Santos Cipriano, F., de Lima, K. S., Allaman, I. B., Tonini, W. C. T., Takishita, S. S., & Braga, L. G. T. (2016). Digestibility and performance of juvenile Nile tilapia fed with diets containing forage palm. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(4), 2417-2426. DOI: 10.5433/1679-0359.2016v37n4Sup1p2417
- Daudpota, A. M., Abbas, G., Kalhor, H., Shah, S. A., Ferrando, S., Gallus, L., Kalhor, I. B., Ghaffar, A., Hussain, R., & Hafeez-Ur-Rehman, M. (2016). Comparison of Growth, Feed Conversion and Body Composition of Juvenile Hybrid Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*) and Nile Tilapia (*O. niloticus*) Reared in Concrete Tanks. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(3), 809-816.
- De Leo, D. M., Ruiz-Ramos, D. V., Baums, I. B., and Cordes, E. E. (2016). Response of deep-water corals to oil and chemical dispersant exposure. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 129, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.02.028>
- Dehkohneh, A., Jafari, P., and Fahimi, H. (2019). Effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* TD3 on moderation of cholesterol biosynthesis pathway in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(9), 1004. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.33933.8073>
- Devic, E., Leschen, W., Murray, F.J., and Little, D.C. (2017). Growth performance, feed utilization and body composition of late-stage Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing black soldier fly (*Hermetia illucens*) larval meal. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 416-423. <https://doi.org/10.1111/anu.12573>
- Dias, P. D. S., Santos, H. K. D., Balen, R. E., Zadinelo, I. V., & Meurer, F. (2022). Energy and nutrient digestibility from mulberry (*Morus alba*) leaf meal for Nile tilapia. *Acta*

- Dindar, N., Mohtadi, A., & Hassanshahian, M. (2019). Effect of diesel contamination and diesel degrading bacteria on *Zea mays* growth and degradation of diesel oil., 8Plant process and function. 85.92(31).
- D'Ortenzio, L., Brickley, M., Schwarcz, H., & Prowse, T. (2015). You are not what you eat during physiological stress: Isotopic evaluation of human hair. *American Journal of Physical Anthropology*, 157(3), 374-388. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22722>
- Dos Santos, L. D., Furuya, W. M., Da Silva, L. C. R., Matsushita, M., and De Castro Silva, T. S. (2011). Dietary conjugated linoleic acid (CLA) for finishing Nile tilapia. *Aquaculture Nutrition*, 17, 70–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00735.x>
- Drtikolova Kaupova, S., Cvrček, J., Grossova, I., Hadrava, J., Půtová, L., and Velemínský, P. (2021). The impact of pathological conditions on carbon and nitrogen isotopic values in the bone collagen of individuals with known biographic data and medical history. *International Journal of Osteoarchaeology*, 31(6), 1105-1124. <https://doi.org/10.1002/oa.3022>
- Dvergedal, O.H., Ødegård, J., Øverland, M., Mydland, L. T., and Klemetsdal, G. (2019). Selection for feed efficiency in Atlantic salmon using individual indicator traits based on stable isotope profiling. *Genetics Selection Evolution*, 51, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0455-9>
- El-Azeem, R. M. (2023). Feminization and Molecular Sexing of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Through Sex Reversal Hormone Diethylstilbestrol and Molecular Markers. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 27(3), 121-130. DOI: 10.21608/ejabf.2023.299886
- Ellefson, W.C. (2017). Fat Analysis. In Nielsen, S. S. (Eds) *Food Analysis*. Food Science (5a ed. pp. 299–314). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_17)
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. (1961). A new and

- rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- El-Sayed, A. F. M., and Kawanna, M. (2007). Effects of photoperiod on growth and spawning efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) broodstock in a recycling system. *Aquaculture Research*, 38(12), 1242-1247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01690.x>
- Elyana, P., Pangastuti, A., and Nugraheni, E. R. (2018). The effect of adding coconut pulp resulting from *Aspergillus oryzae* fermentation in commercial feed on the growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cell Biology and Development*, 2(1).<https://doi.org/10.13057/cellbioldev/v020105>
- Fabrikov, D., Vargas-García, M. D. C., Barroso, F. G., Sánchez-Muros, M. J., Cacia Ortíz, S. M., Morales, A. E., Cardenete, G., Almenar, C. T & Melenchón, F. (2021). Effect on intermediary metabolism and digestive parameters of the high substitution of fishmeal with insect meal in *Sparus aurata* feed. *Insects*, 12(11), 965. <https://doi.org/10.3390/insects12110965>
- Fahey, G. C., Novotny, L., Layton, B., and Mertens, D. R. (2019). Critical Factors in Determining Fiber Content of Feeds and Foods and Their Ingredients. *Journal of AOAC International*, 102(1), 52-62. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0067>
- FAO (2024). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. La transformación azul en acción. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cd0690es>
- FAO. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018: Meeting the Sustainable Development Goals. (Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, 2018).
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: Contributing to Food Security and Nutrition for All. (Food and Agriculture Organization (FAO) of the United

Nations, 2016).

- Fauzi, A. R., Yuhana, M., Setiawati, M., & Afiff, U. (2024). Effect of Dayak Onion (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) on the Immune Response and Gene Expression of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Infected with *Aeromonas hydrophila*. *Scientific Journal of Fisheries & Marine/Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, *16*(1). <http://doi.org/10.20473/jipk.v16i1.44079>
- Felip, O., Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Beltrán, M., Martín-Pérez, M., Planas, J. V., and Blasco, J. (2012). Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes ([<sup>13</sup>C] starch and [<sup>15</sup>N] protein): effects of gelatinisation of starches and sustained swimming. *British Journal of Nutrition*, *107*(6), 834-844. <https://doi.org/10.1017/S0007114511003709>
- Figueredo, C. C., & Giani, A. (2005). Ecological interactions between Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) and the phytoplanktonic community of the Furnas Reservoir (Brazil). *Freshwater Biology*, *50*(8), 1391-14 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01407.x>
- Frapiccini, E., Annibaldi, A., Betti, M., Polidori, P., Truzzi, C., and Marini, M. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in different common sole (*Solea solea*) tissues from the North Adriatic Sea peculiar impacted area. *Marine Pollution Bulletin*, *137*, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.002>
- Frédérich, B., Colleye, O., Lepoint, G., and Lecchini, D. (2012). Mismatch between shape changes and ecological shifts during the post-settlement growth of the surgeonfish, *Acanthurus triostegus*. *Frontiers in Zoology*, *9*, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-9-8>
- Freitas, J. S., Pereira, T. S. B., Boscolo, C. N. P., Garcia, M. N., de Oliveira Ribeiro, C. A., and de Almeida, E. A. (2020). Oxidative stress, biotransformation enzymes and histopathological alterations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to new and used automotive lubricant oil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *234*, 108770.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108770>

Fry, B. (2006). *Stable Isotope Ecology*. Springer Science. NY, USA. 121-134 pp.

Fujimura, K., & Okada, N. (2007). Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: *Cichlidae*). Developmental staging system. *Development, growth & differentiation*, 49(4), 301-324. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00926.x>

Gamboa-Delgado, J. (2022). Isotopic techniques in aquaculture nutrition: State of the art and future perspectives. In *Reviews in Aquaculture*, 14 (1), 456–476). <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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.012>

Gamboa-Delgado, J., Nieto-López, M. G., Maldonado-Muñiz, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., & 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., Rodríguez Montes de Oca, G. A., Román Reyes, J. C., Villarreal-Cavazos, D. A., Nieto-López, M., and Cruz-Suárez, L. E. (2016). Assessment of the relative contribution of dietary nitrogen from fish meal and biofloc meal to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture research*, 48(6), 2963-2972. <https://doi.org/10.1111/are.13129>

Gamboa-Delgado, J., & Márquez-Reyes, J. M. (2016). Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. In *Reviews in Aquaculture* , 10(1), 224–246. <https://doi.org/10.1111/raq.12157>

Ganesan, K., Jayachandran, M., and Xu, B. (2018). A critical review on hepatoprotective

- effects of bioactive food components. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(7), 1165-1229. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1244154>
- Gao, Y., Li, Z., Hana, G., Qiang, L., Sun, Y., Tan, R., and Yu Y. (2023). Effects of the water-soluble fraction of diesel oil on the sera biochemical indicators, histological changes, and immune responses of black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Marine Environmental Research*, 187, 105953. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105953>
- García-Medel, D. I. (2022). Seguridad alimentaria: retos y desafíos De La Acuicultura en México. *Journal of Behavior and Feeding*, 2(2), 10-19. <https://doi.org/10.32870/jbf.v2i2.31>.
- 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., & 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., and Marroquín-Cardona, A. G. (2019). 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, M. (2012). Physiological changes in the muscle of gilthead sea bream

induced by culture and feeding conditions: a stable isotopes ( $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$ ) and proteomic study [Tesis doctoral, Universidad de Barcelona]. Dipòsit Digital de la Universitat de Barcelona.

García-Ponce, R. (2019). Evaluación de alternativas fitoterapéuticas y acaricidas sintéticos sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarí: Ixodidae) [Tesis maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Biblios-e Archivo.

Garlock, T., Asche, F., Anderson, J., Bjørndal, T., Kumar, G., Lorenzen, K., Ropicki, A., Smith, M.D., and Tveterås, R. (2019). A global blue revolution: aquaculture growth across regions, species, and countries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(1), 07-116. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1678111>.

Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. *Journal of clinical gastroenterology*, 50. Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015, S116–S119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>

Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Abel, H. y 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. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0496-2>

Geletu, T. T., & Zhao, J. (2022). Genetic resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) in its native range and aquaculture. *Hydrobiologia*, 850(10), 2425-2445.

Glencross, B. D., Baily, J., Berntssen, M. H., Hardy, R., MacKenzie, S., and Tocher, D. R. (2019). Risk assessment of the use of alternative animal and plant raw material resources in aquaculture feeds. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 703-758. <https://doi.org/10.1111/raq.12347>

Glencross, B. D., Bachis, E., Betancor, M. B., Calder, P., Liland, N., Newton, R., & Ruyter, B. (2024). Omega-3 futures in aquaculture: Exploring the supply and demands

- for long-chain omega-3 essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1-50. <https://doi.org/10.1080/23308249.2024.2388563>
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327(5967), 812-818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- Gokulakrishnan, M., Kumar, R., Ferosekhan, S., Siddaiah, G. M., Nanda, S., Pillai, B. R., and Swain, S. K. (2023). Bio-utilization of brewery waste (Brewer's spent yeast) in global aquafeed production and its efficiency in replacing fishmeal: From a sustainability viewpoint. *Aquaculture*, 565, 739161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739161>
- Hallerman, E. and A.W.S. Hilsdorf . 2014. Conservation genetics of tilapias: Seeking to define appropriate units for management. *Isr. J. Aquacult.-Bamidgeh* 66: 2–19.
- Han, D., Shan, X., Zhang, W., Chen, Y., Wang, Q., Li, Z., Zhang, G., Xu, P., Li, J., Xie, S., Mai, K., Tang, Q., & De Silva, S. S. (2016). A revisit to fishmeal usage and associated consequences in Chinese aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 493–507. <https://doi.org/10.1111/raq.12183>
- Hasan, A., M., Ferdous, S., R., Islam, S., M., Haghiri, M., and Shahjahan, M. (2022). Response and recovery of Nile tilapia exposed to diesel oil – Behavioral, hemato-biochemical and morphological changes of erythrocytes. *Toxicology Reports*, 9, 549555. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.039>
- Hayden, B., Tongnunui, S., Beamish, F. W. H., Nithirojapakdee, P., and Cunjak, R. A. (2017). Variation in stable-isotope ratios between fin and muscle tissues can alter assessment of resource use in tropical river fishes. *Journal of fish biology*, 91(2), 574-586. <https://doi.org/10.1111/jfb.13368>
- He, J. Y., Han, B., Tian, L. X., Yang, H. J., Zeng, S. L., & Liu, Y. J. (2016). The sparing

- effect of cystine on methionine at a constant TSAA level in practical diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, 47(7), 2031-2039. <https://doi.org/10.1111/are.12657>
- He, Y., Jinno, C., Kim, K., Wu, Z., Tan, B., Li, X., Whelan, R., & Liu, Y. (2020). Dietary *Bacillus* spp. enhanced growth and disease resistance of weaned pigs by modulating intestinal microbiota and systemic immunity. *Journal of animal science and biotechnology*, 11, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00498-3>
- Hernández-Lozano, E., G. & Fajardo-Delgado, H., D (2019). Evaluación de la productividad de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con tres pesos iniciales y tres densidades de siembra en un sistema de recirculación, Managua, 2017-2018. [Tesis licenciatura, Universidad Nacional Agraria, Facultad de Ciencia Animal]. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/3937>
- Herzka, S. Z. (2005). Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ratio analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64(1), 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2005.02.006>
- 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.
- Hodar, A. R., Vasava, R. J., Mahavadiya, D. R., and Joshi, N. H. (2020). Fish meal and fish oil replacement for aqua feed formulation by using alternative sources: a review. *Journal of Experimental Zoology India*, 23(1). <https://connectjournals.com/03895.2021.24.719>
- Hopper, Z., Desbrow, B., Roberts, S., & Irwin, C. (2023). Preparation procedures of food and beverage samples for oxygen bomb calorimetry: A scoping review and reporting checklist. *Journal of Food and Drug Analysis*, 31(2), 232-243. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3461>

- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M. and Strugnell, J. M. (2019). The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, 1(3), 316-329. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>
- Huang, F., Wang, L., Zhang, C. X., and Song, K. (2017). Replacement of fishmeal with soybean meal and mineral supplements in diets of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity water. *Aquaculture*, 473, 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.011>
- Huang, T. L., Obih, P. O., Jaiswal, R., Hartley, W. R., 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. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 688-695.
- Huarilloclla-Ramos, R. (2022). Efecto de la adición de biofloc como complemento [Tesis licenciatura, Universidad Nacional de Monquegua]. <https://repositorio.unam.edu.pe/items/ab08346a-bfea-4dfa-b5d5-b88e91d679d6>
- Hussey, N. E., MacNeil, M. A., & Fisk, A. T. (2010). The requirement for accurate diet-tissue discrimination factors for interpreting stable isotopes in sharks: Comment on: stable isotope dynamics in elasmobranch fishes. *Hydrobiologia*, 654, 1-5. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0361-1>
- INAPESCA (2018). Acuicultura tilapia. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-tilapia>.
- Jantrakajorn, S., & Wongtavatchai, J. (2015). Egg surface decontamination with bronopol increases larval survival of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. doi: 10.17221/8523-CJAS
- Jenkins, W. G., Demopoulos, A. W., Nicholson, M. D., & Sikkel, P. C. (2020). Stable isotope dynamics of herbivorous reef fishes and their ectoparasites. *Diversity*, 12(11), 429. <https://doi.org/10.3390/d12110429>

- Jonas, M., Ketlogetswe, C., & Gandure, J. (2020). Variation of *Jatropha curcas* seed oil content and fatty acid composition with fruit maturity stage. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03285>
- Kamble, M. T., Salin, K. R., Chavan, B. R., Medhe, S. V., Thompson, K. D., and Pirarat, N. (2024). Length-weight relationship and condition factor of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemented with guava and star gooseberry leaf extract. *F1000Research*, 13, 540. <https://doi.org/10.12688/f1000research.145369.2>
- Katić, S., Milić, D., Karagić D., Vasiljević, S., Glamočić, D., and Jajić, I. (2009). Variation of protein, cellulose and mineral contents of lucerne as influenced by cultivar and cut. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (5-6), 1189-1195.
- Kaushik, S. J., & Luquet, P. (1980). Influence of bacterial protein incorporation and of sulphur amino acid supplementation to such diets on growth of rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson. *Aquaculture*, 19(2), 163-175. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(80\)90017-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90017-4)
- Khalil, F. F., Farrag, F. H., El Shebly, A. A. and Behery, A. M. (2015). Intensive different stocking densities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* under mono-or polyculture systems in floating net cages rearing in Manzala lake, Egypt. *Journal of Animal and Poultry Production*, 6(7), 493-505. <https://doi.org/10.21608/jappmu.2016.52906>
- Kizil, R., & Irudayaraj, J. (2018). Spectroscopic Technique: Fourier Transform Raman (FT-Raman) Spectroscopy. In *Modern techniques for food authentication* (pp. 193-217). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00006-2>
- Konnert, G. D., Gerrits, W. J., Gussekloo, S. W., and Schrama, J. W. (2022). Balancing protein and energy in Nile tilapia feeds: A meta-analysis. *Reviews in Aquaculture*, 14(4), 1757-1778. <https://doi.org/10.1111/raq.12671>
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., Sakyi, M. E., Lu, Y., & Wang, Z. (2020). Modulation of nutrient utilization, growth, and immunity of Nile tilapia, *Oreochromis*

- niloticus*: the role of probiotics. In *Aquaculture International* 28(1), 277–291. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00463-6>
- Kunda, M., Pandit, D., & Harun-Al-Rashid, A. (2021). Optimization of stocking density for mono-sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in riverine cage culture in Bangladesh. *Heliyon*, 7(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08334>
- Lala, V., Zubair, M. & Minter, D. A. (2023) Liver Function Tests. StatPearls. Treasure Island (FL). PMID: 29494096
- Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., and Korma, S. A. (2023). Probiotics: Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1216674. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674>
- Li, W., Zhang, Z., Zhang, R., Sun, A., Lu, Y., Chen, J., & Shi, X. (2021). Spatiotemporal occurrence, sources and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical mariculture ecosystem. *Water Research*, 204, 117632. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117632>
- Liu, Y., Zai, X., Weng, G., Ma, X., & Deng, D. (2024). *Brevibacillus laterosporus*: A Probiotic with Important Applications in Crop and Animal Production. *Microorganisms*, 12(3), 564. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030564>
- MacKenzie, K. M., Palmer, M. R., Moore, A., Ibbotson, A. T., Beaumont, W. R., Poulter, D. J., and Trueman, C. N. (2011). Locations of marine animals revealed by carbon isotopes. *Scientific reports*, 1(1), 21. <https://doi.org/10.1038/srep00021>
- Magbanua, T. O., & Ragaza, J. A. (2024). Selected dietary plant-based proteins for growth and health response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture and Fisheries*, 9(1), 3-19.
- Magouz, FI, Radwan, I., Soltan, H. O., and El-Keredy, A. (2023). Synbiotic lactic dry®

- improved growth performance, growth-related genes, intestinal health and immunity of Nile tilapia reared in inland brackish groundwater. *Annals of Animal Science*, 23(2), 495-504. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0066>
- Mahfouz, M. E., & Sherif, A. H. (2015). A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 71, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.04.008>
- Malek, A. J., Collie, J. S., & Taylor, D. L. (2016). Trophic structure of a coastal fish community determined with diet and stable isotope analyses. *Journal of Fish Biology*, 89(3), 1513-1536. <https://doi.org/10.1111/jfb.13059>
- Martin Penadillo, R. (2018). Desempeño bioeconómico de cuatro niveles de inclusión de harina de cáscara de theobroma cacao l (cacao) en dietas de *Oreochromis niloticus* (tilapia) en fase de engorde [Tesis licenciatura, Universidad Nacional Agraria de la Selva]. <https://hdl.handle.net/20.500.14292/1462>
- Martínez-Cordova, L. R., Campana Torres, A., & Porchas-Cornejo, M. A. (2003). Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. *Aquaculture Nutrition*, 9(3), 155-160. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00235.x>
- Martínez del Rio, C., Wolf, N., Carleton, S. A., and Gannes, L. Z. (2009). Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews*, 84(1), 91-111. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00064.x>
- Martínez-Rocha, L., Gamboa-Delgado, J., Nieto-López, M., Ricque-Marie, D., & Cruz-Suárez, L. E. (2012). Incorporation of dietary nitrogen from fish meal and pea meal (*Pisum sativum*) in muscle tissue of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low protein compound diets. *Aquaculture Research*, 44(6), 847-859. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03083.x>
- Mashaii, N., Rajabipour, F., Bitaraf, A., Hosseinzadeh, H., Rohani, M. S., Sarsangi, H., & Mohammadi, M. (2022). Reproductive biology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

- under the brackish water culture condition. *Int. J. Food Sci. Agric*, 6, 4-7.  
<http://www.hillpublisher.com/journals/jsfa/>
- May, J. (2018). Keystones affecting sub-Saharan Africa's prospects for achieving food security through balanced diets. *Food Research International*, 104, 4-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.062>
- McGill, K. C., Yasechko, M. L., and Nkari, W. K. (2004). Determination of Calories in Food Via Adiabatic Bomb Calorimeter. *The Corinthian*, 6(9).  
<https://kb.gcsu.edu/thecorinthian/vol6/iss1/9>
- Minarik, T. A., Vick, J. A., Schultz, M. M., Bartell, S. E., Martinovic-Weigelt, D., Rearick, D. C., and Schoenfuss, H. L. (2014). On-site exposure to treated wastewater effluent has subtle effects on male fathead minnows and pronounced effects on carp. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 50(2), 358-375.  
<https://doi.org/10.1111/jawr.12167>
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of applied microbiology*, 124(6), 1334-1346. <https://doi.org/10.1111/jam.13690>
- Mmanda, F. P., Lindberg, J. E., Norman Haldén, A., Mtolera, M. S., Kitula, R., and Lundh, T. (2020). Digestibility of local feed ingredients in tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles, determined on faeces collected by siphoning or stripping. *Fishes*, 5(4), 32.  
<https://doi.org/10.3390/fishes5040032>
- Mocho, J. P., & von Krogh, K. (2022). A FELASA working group survey on fish species used for research, methods of euthanasia, health monitoring, and biosecurity in Europe, North America, and Oceania. *Biology*, 11(9), 1259.  
<https://doi.org/10.3390/biology11091259>
- Mohan, JA, Smith, SD, Connelly, TL, Attwood, ET, McClelland, JW, Herzka, SZ y Walther, BD (2016). Tissue-specific isotope turnover and discrimination factors are affected by diet quality and lipid content in an omnivorous consumer. *Journal of*

Experimental Marine Biology and Ecology, 479, 35-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.03.002>

Mosquera-Medina, S. (2018). Evaluación del efecto de la restricción alimenticia en el crecimiento compensatorio en la Tilapia roja (*Oreochromis sp*) durante las fases de levante y finalización. [Tesis maestría, Universidad de Nariño].  
<http://sired.udenar.edu.co/id/eprint/8484>

Munguti, J. M., Nairuti, R., Iteba, J. O., Obiero, K. O., Kyule, D., Opiyo, M. A., Abwao, J., Kirimi, J. G., Outa, N., Muthoka, M., Githukia, C. M., & Ogello, E. O. (2022). Nile tilapia (*Oreochromis niloticus Linnaeus, 1758*) culture in Kenya: Emerging production technologies and socio-economic impacts on local livelihoods. *Aquaculture, Fish and Fisheries*, 2(4), 265-276. <https://doi.org/10.1002/aff2.58>

Munir, M. B., Hashim, R., Chai, Y. H., Marsh, T. L., & Mohd Nor, S. A. (2016). Dietary prebiotics and probiotics influence growth performance, nutrient digestibility, and immune-regulatory gene expression in juvenile *Channa striata* (*striped snakehead*). *Aquaculture*, 460, 59–68. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.03.041

Nairuti, R.N., Munguti, J.M., Waidbacher, H., and Zollitsch, W. (2021). Growth performance and survival rates of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*) reared on diets containing black soldier fly (*Hermetia illucens L.*) larvae meal. *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, 72(1), 9-19.  
<https://doi.org/10.2478/boku-2021-0002>

Nardone, G., Compare, D., Liguori, E., Di Mauro, V., Rocco, A., Barone, M., and Colantuoni, A. (2010). Protective effects of *Lactobacillus paracasei* F19 in a rat model of oxidative and metabolic hepatic injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(3), G669-G676.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00188.2010>

National Research Council (NRC). (2011). *Nutritional Requirements of fish and shrimp*. National Academic Press. Washington D.C.

- Naylor, R., Fang, S., and Fanzo, J. (2023). A global view of aquaculture policy. *Food Policy*, 116, 102422. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2023.102422>
- Naylor, R., L., Hardy, R., W., Buschmann, A., H., Bush, S., R., Cao, L., Klinger, D., H., Little, D., C., Lubchenco, J., Shumway, S., E. and Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591(7851), 551-563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>
- Naz, S., Chatha, A. M. M., Khan, R. U., Iqbal, S., Amjad, N., Kiran, A., Lateef, M., and Nawaz, A. (2023). Current status of fish diversity and abundance at Panjnad headworks Bahawalpur, Punjab, Pakistan. *Pak J Zool*, 55(6). <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20220411080448>
- Newton, R. W., Maiolo, S., Malcorps, W., and Little, D. C. (2023). Life cycle inventories of marine ingredients. *Aquaculture*, 565, 739096. [10.1016/j.aquaculture.2022.739096](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739096).
- Nguyen, T. N., & Allen Davis, D. (2009). Methionine requirement in practical diets of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the world aquaculture society*, 40(3), 410-416. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00261.x>
- Niyibizi, L. (2023). Evaluation of locally available feed resources for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Rwanda. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, (2023: 5). <https://doi.org/10.54612/12/10.54612/a.7kfv2lroro>
- Nos, D., Navarro, J., Macías, D., y Solé, M. (2021). Carboxylesterase activities as potential biomarkers of pollution in marine pelagic predators. *Ecological Indicators*, 122, 107217. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107217>
- Nunes, A. J., Dalen, L. L., Leonardi, G., and Burri, L. (2022). Developing sustainable, cost-effective and high-performance shrimp feed formulations containing low fish meal levels. *Aquaculture reports*, 27, 101422. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101422>
- Nunes, B., & Costa, M. (2019). Study of the effects of zinc pyrithione in biochemical

- parameters of the Polychaeta *Hediste diversicolor*: evidences of neurotoxicity at ecologically relevant concentrations. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 13551-13559. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04810-1>
- Nuryanto, N., Afifah, D. N., Sulchan, M., Martosuyono, P., Ihsani, K., & Kurniastuti, P. L. (2022). Potential of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as an alternative complementary food ingredient for stunting children. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 10(A), 1170-1177. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.9650>
- O'Connell, T. (2017). 'Trophic' and 'source' amino acids in trophic estimation: a likely metabolic explanation. *Oecologia*, 184(2), 317-326. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3881-9>
- OECD/FAO (2020), OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/a0848ac0-es>.
- Oliveira, L. K., Pilz, L., Furtado, P. S., Ballester, E. L. C., & de Almeida Bicudo, A. J. (2021). Growth, nutritional efficiency, and profitability of juvenile GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in biofloc system on graded feeding rates. *Aquaculture*, 541, 736830. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736830>
- Ortiz-Tello, L., A (2017). Evaluación de biomarcadores fisiológicos en salamandras (*ambystoma sp.*) En localidades del sur de Nuevo León [Tesis maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Biblios-e Archivo.
- Overland, 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. <https://doi.org/10.1080/17450391003691534>
- Overton, K., Dempster, T., Swearer, S. E., Morris, R. L., and Barrett, L. T. (2023). Achieving conservation and restoration outcomes through ecologically beneficial aquaculture. *Conservation Biology*, 38(1), e14065. <https://doi.org/10.1111/cobi.14065>

- Pacheco-Vega, J. M., Gamboa-Delgado, J., Alvarado-Ibarra, A. G., Nieto-López, M. G., Tapia-Salazar, M., and Cruz-Suárez, L. E. (2018). Nutritional contribution of fish meal and microalgal biomass produced from two endemic microalgae to the growth of shrimp *Penaeus vannamei*. Latin american journal of aquatic research, 46(1), 53-62. <http://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue1-fulltext-7>
- Pankaj-Kumar, A. (2020). Bacilli-mediated degradation of xenobiotic compounds and heavy metals. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 570307. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570307>
- Paredes-Trujillo, A., Mendoza-Carranza, M., del Río-Rodríguez, R. E., and Cerqueda-García, D. (2022). Comparative assessment of metazoans infestation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)(L.)(Perciformes: Cichlidae) in floating cages and ponds from Chiapas, Mexico. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 34, 100757. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100757>
- Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 70(1), 406-438. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>
- Pedersen, B., & Eggum, B. O. (1983). Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. Zeitschrift Für Tierphysiologie Tierernährung Und Futtermittelkunde, 49(1-5), 265-277. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1983.tb00808.x>
- Pedrazzani, AS, Cozer, N., Quintiliano, MH, Tavares, CPDS, Biernaski, V., y Ostrensky, A. (2023). From egg to slaughter: monitoring the welfare of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, throughout their entire life cycle in aquaculture. Frontiers in Veterinary Science , 10 , 1268396 <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1268396>
- Pei, S., Liu, P., Parker, DA, Mackie, RI y Rao, CV (2022). Systems analysis of the effect

- of hydrogen sulfide on the growth of *Methylococcus capsulatus* Bath. Applied Microbiology and Biotechnology, 106 (23), 7879-7890. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12236-y>
- Perea, M. F., Perdomo, D. A., Corredor, Z. A., González, M., Hernandez-Fonseca, H., & Perea, F. P. (2022). Lunar cycle influences production of tilapia (*Oreochromis spp*) eggs in an intensive outdoor production system in the tropics. Journal of Biological Rhythms, 37(2), 177-184. <https://doi.org/10.1177/074873042110694>
- Pérez-Lopez N., E. & Gómez Zapata. (2018). Inclusión de Ácido ascórbico en la dieta y su efecto sobre el crecimiento de tilapias grises *Oreochromis niloticus*. [Tesis licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León]. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/6319>
- Phillips D.L., & Gregg J.W. (2003) Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. Oecologia 136, 261-269 <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1218-3>
- Phillips D.L., & Gregg J.W. (2001) Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. Oecologia 127, 171–179. (see also erratum, Oecologia 128, 204). <https://doi.org/10.1007/s004420000578>
- Pomares, VE & Velázquez, HV (2022). Factores de viabilidad ambiental y de mercado para establecer una granja acuícola semitecnificada dedicada a la producción de *Oreochromis niloticus* . Rev. Iberoam. Bioeconomía. Cambio Climático. 8, 1992–2006. <https://doi.org/10.5377/ribcc.v8i16.15148>
- Pomeranz, Y., & Meloan, E.C. (1994) Food Analysis: Theory and Practice. 3rd Edition, Chapman and Hall, New York.
- Popović, T., N., Čižmek, L., Babić, S., Strunjak-Perović, I., and Čož-Rakovac, R. (2023). Fish liver damage related to the wastewater treatment plant effluents. Environmental science and pollution research, 30(17), 48739-48768. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26187-y>

- Preston, N. P., Smith, D. M., Kellaway, D. M., and Bunn, S. E. (1996). The use of enriched  $^{15}\text{N}$  as an indicator of the assimilation of individual protein sources from compound diets for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 147(3-4), 249-259. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01404-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01404-4)
- Puppo, D. D., Haese, D., Gomes, L. D. C., Kill, J. L., Brugnara, E. C., Barcellos, J., Haddade, I. R., and Ton, N. C. (2017). Optimization of crude protein in diets for Nile tilapia reared in net pens: performance, hematology, and water quality. *Ciência Rural*, 47, e20160502. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160502>
- Reitsema, L. J. (2013). Beyond diet reconstruction: stable isotope applications to human physiology, health, and nutrition. *American Journal of Human Biology*, 25(4), 445-456. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22398>
- Reyes-Trigueros, L., del Carmen Monroy-Dosta, M., Torres-Ochoa, E., Cortés-Sánchez, A. D. J., & Espinosa-Chaurand, L. D. (2023). Reproductive parameters in the fingerling production of tilapia *Oreochromis niloticus*. *La Granja*, 38(2), 122-134. <http://doi.org/10.17163/lgr.n38.2023.09>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.001>
- 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*.
- Rivera Vasconcelos, F., Menezes, R. F., & Attayde, J. L. (2018). Effects of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on the plankton community of a tropical reservoir during and after an algal bloom. *Hydrobiologia*, 817, 393-401. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3591->
- Saldaña-Serrano, M., Velasquez-Bastolla, C., L., Mattos, J. J., de Lima, D., Piazza, C. E.,

- Righetti, B. P. H., Martiol, R., Dias, V. H. V., Ferreira, C. P., Nogueira, D. J., Gomes, C. H. A. de M., Taniguchi, S., Bicego, M. C., y Bainy, A. C. D. (2024). Biochemical responses in Pacific oysters *Magallana gigas* (Thunberg, 1793): Tools to evaluate the environmental quality of aquaculture areas. *Marine Pollution Bulletin*, 201, 116244. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116244>
- Salger, S. A., Reza, J., Deck, C. A., Wahab, M. A., Baltzegar, D. A., Murr, A. T., & Borski, R. J. (2020). Enhanced biodiversity of gut flora and feed efficiency in pond cultured tilapia under reduced frequency feeding strategies. *Plos One*, 15(7), e0236100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236100>
- Samaddar, A. (2022). Recent trends on Tilapia cultivation and its major socioeconomic impact among some developing nations: A Review. *Asian J. Fish. Aquat. Res*, 8, 1-10. <https://doi.org/10.9734/ajfar/2022/v16i430376>.
- Sánchez-Vázquez, F. J., & Fortes-Silva, R. (2021). *Biology and aquaculture of tilapia*. J. F. López-Olmeda (Ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Sandoval-Gallardo, J. M., Osuna-Ruiz, I., Martínez-Montaña, E., Hernández, C., Hurtado-Oliva, M. Á., Bañuelos-Vargas, M. I., Ríos-Herrera, G. D., Heredia, J. B., Ramírez-Pérez, J. S., and Salazar-Leyva, J. A. (2022). Use of Pacific thread herring (*Opisthonema libertate*) protein hydrolysates in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) feeds: Productive performance and antioxidant enzymes on organisms exposed to a heat-induced stress. *Aquaculture Research*, 53(17), 6135-6147. <https://doi.org/10.1111/are.16087>
- Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., McQuin, B., Fitzgerald, D. S., Nash, H. M., and Greenwood, C. (2020). Microalgae-blend tilapia feed eliminates fishmeal and fish oil, improves growth, and is cost viable. *Scientific Reports*, 10(1), 19328. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75289-x>
- Schmidt, V., Amaral-Zettler, L., Davidson, J., Summerfelt, S., & Good, C. (2016). Influence of fishmeal-free diets on microbial communities in Atlantic salmon (*Salmo salar*) recirculation aquaculture systems. *Applied and Environmental*

- Microbiology, 82(15), 4470-4481. <https://doi.org/10.1128/AEM.00902-16>
- Senthilkumaran, B., Sreenivasulu, G., Wang, D. S., Sudhakumari, C. C., Kobayashi, T., & Nagahama, Y. (2015). Expression patterns of CREBs in oocyte growth and maturation of fish. *PLoS One*, 10(12), e0145182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145182>
- Shaker, I. M., Abou Zead, M. Y., & Farouk, A. E. D. (2016). Economic impacts of ponds management on water quality and growth performance of fish in polyculture. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 20(4), 47-60.
- Shannon, L., & Waller, L. (2021). A cursory look at the fishmeal/oil industry from an ecosystem perspective. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.645023>
- Sharda, P., Sharma, O. P., & Saini, V. P. (2017). Replacement of fishmeal with soybean meal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet. *Journal of Entomology and Zoology studies*, 5(4), 845-849.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., & Komagata, K. (1996). Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 46(4), 939-946. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-939>
- Simon, C. J., Blyth, D., Fatan, N. A., & Suri, S. (2019). Microbial biomass (Novacq™) stimulates feeding and improves the growth performance on extruded low to zero-fishmeal diets in tilapia (GIFT strain). *Aquaculture*, 501, 319-324. <https://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.052>
- Singh, Davinder Pal, Khattar, J. S., Rajput, A., Chaudhary, R. & Singh, R. (2019). High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. *PLoS ONE*, 14(9), 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221930>
- Singh, Y., Singh, B., and Sharma, S. (2021). Determination of total, available, mineral,

non-exchangeable ammonium and potentially mineralizable nitrogen in soil. Researchgate. <https://www.researchgate.net/publication/350123952>

Skinner, M. M., Cross, B. K., and Moore, B. C. (2016). Estimating in situ isotopic turnover in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle and liver tissue. *Journal of Freshwater Ecology*, 32(1), 209-217. <https://doi.org/10.1080/02705060.2016.1259127>

Skrede, A., Berge, G. M., Storebakken, T., Herstad, O., Aarstad, K. G., & Sundstøl, F. (1998). Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon. *Animal Feed Science and Technology*, 76(1-2), 103-116. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00208-9)

Sorensen, M. (2012). A review of the effects of ingredient composition and processing conditions on the physical qualities of extruded high-energy fish feed as measured by prevailing methods. *Aquaculture Nutrition* 18(3), 233-248 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00924.x>

Souza, F.P.D., Lima, E.C.S.D, Urrea-Rojas, A.M., Suphoronski, S.A., Facimoto, C.T., Bezerra Júnior, J.D.S, Oliveira, T. E. de S., Pereira, U. de P. ,Di-Santis, G. W., Oliveira de López, C. A., and Lopera-Barrero, NM (2020). Effects of dietary supplementation with a microalga (*Schizochytrium* sp.) on the hemato-immunological, and intestinal histological parameters and gut microbiota of Nile tilapia in net cages. *PloS one*, 15(1), e0226977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226977>

Stephens, R. B., Shipley, O. N., & Moll, R. J. (2023). Meta-analysis and critical review of trophic discrimination factors ( $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$ ): Importance of tissue, trophic level and diet source. *Functional Ecology*, 37(9), 2535-2548. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14403>

Suryaningrum, L. H., & Samsudin, R. (2020). Nutrient digestibility of green seaweed *Ulva* meal and the influence on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 32(7), 488-494. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i7.2131>

- Taheur, F., B., Mansour, C., Mechri, S., Laaouar, H., Skhiri, S., S., Bouricha, M., Jaouadi, B., Mzoughi, R. and Zouari, N. (2022). Protective effects of dietary Kefir against aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in Nile tilapia fish, *Oreochromis niloticus*. *Food Science & Nutrition*, 10(7), 2300-2311. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2838>
- Teles, A. O., Couto, A., Enes, P., and Peres, H. (2020). Dietary protein requirements of fish—a meta-analysis. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1445-1477. <https://doi.org/10.1111/raq.12391>
- Temesgen, M., Getahun, A., Lemma, B., and Janssens, G. P. (2022). Food and feeding biology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Lake Langeno, Ethiopia. *Sustainability*, 14(2), 974. <https://doi.org/10.3390/su14020974>
- Tesfahun, A., & Temesgen, M. (2018). Food and feeding habits of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in Ethiopian water bodies: A review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(1), 43-47.
- Therrien, J. F., Fitzgerald, G., Gauthier, G., and 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.
- Thiex, N., & J., Richardson, C. (2003). Challenges in measuring the moisture content of foods. *Journal of Animal Science*, 81(12), 3255-3266. <https://doi.org/10.2527/2003.81123255x>
- Thiex, N., Novotny, L., & Crawford, A. (2012). Determination of Ash in Animal Feed: AOAC Official Method 942.05 Revisited. *Journal of AOAC International*, 95(5,1), 1392-1397. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-129>
- Thompson, M., Owen, L., Wilkinson, K., Wood, R., and Damant, A. (2002) A comparison of the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of protein in foods, using data from a proficiency testing scheme. *Analyst*, 127(12), 1666-8. <https://doi:10.1039/b208973b>.
- Topić Popović, N., Čižmek, L., Babić, S., Strunjak-Perović, I., and Čož-Rakovac, R.

- (2023). Fish liver damage related to the wastewater treatment plant effluents. *Environmental science and pollution research*, 30(17), 48739-48768. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26187-y>
- Tran-Duy, A., van Dam, A. A., and Schrama, J. W. (2011). Feed intake, growth and metabolism of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in relation to dissolved oxygen concentration. *Aquaculture Research*, 43(5), 730-744. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02882.x>
- Trewavas, E. 1983. Tilapiine Fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum Natural History, London, UK.
- Triay, C., Courcelle, M., Caminade, P., Bezault, E., Baroiller, J. F., Kocher, T. D., and D`Cotta, H. (2022). Polymorphism of sex determination amongst wild populations suggests its rapid turnover within the Nile tilapia species. *Frontiers in genetics*, 13, 820772. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.820772>
- Trommelen, J., Tomé, D., and van Loon, L. J. (2021). Gut amino acid absorption in humans: concepts and relevance for postprandial metabolism. *Clinical Nutrition Open Science*, 36, 43-55 <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2020.12.006>
- Tulli, F., Moreno-Rojas, J. M., Messina, C. M., Trocino, A., Xiccato, G., Muñoz-Redondo, J. M., Santulli, A. and Tibaldi, E. (2020). The use of stable isotope ratio analysis to trace European sea bass (*D. Labrax*) originating from different farming systems. *Animals*, 10(11), 2042. <https://doi.org/10.3390/ani10112042>
- Turchini, G. M., Quinn, G. P., Jones, P. L., Palmeri, G., and Gooley, G. (2008). Traceability and discrimination among differently farmed fish: a case study on Australian Murray cod. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(1), 274-281. <https://doi.org/10.1021/jf801962h>
- Turchini, G. M., Trushenski, J. T., and Glencross, B. D. (2018). Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. *North American Journal of*

- Aquaculture, 81(1), 13-3. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>
- Undersander, D., Mertens, D. R., and Thiex, N. (Julio 1993). Forage analysis procedures. Method 2.1.2. National Forage Testing Association (NFTA).
- UNDESA. (2015). División de la población. World population prospects: The 2015 revision. “Perspectivas de la población mundial: revisión de 2015”, edición de DVD.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022). World Population Prospects 2022: Ten Key Messages. [https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022\\_key\\_messages.pdf](https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_key_messages.pdf)
- Vajargah, M. F. (2021). A review of the physiology and biology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J Aquac Mar Biol, 10(5), 244-246. <https://doi.org/10.15406/jamb.2021.10.00328>
- Van Doan, H., Lumsangkul, C., Jaturasitha, S., Meidong, R., Hoseinifar, S. H., and Dawood, M. A. (2021). Modulation of growth, skin mucus and serum immunities, and disease resistance of Nile tilapia fed host-associated probiotic (*Lactobacillus paracasei* 161-27b). Aquaculture Nutrition, 27, 3-12. <https://doi.org/10.1111/anu.13314>
- Vázquez-Vera, L. & Chávez-Carreño, P. Eds. (2022). Diagnóstico de la acuicultura en México. ISBN: 978-607-99061-5-3.m Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza, A.C. México
- Vega-Villasante, F., Cortés-Lara, MC, Zúñiga-Medina, LM, Jaime-Ceballos, B., Galindo-López, J., Basto-Rosales, M., E., R., & Nolasco-Soria, H. (2010). Cultivo a pequeña escala de tilapia (*Oreochromis niloticus*), ¿alternativa alimentaria para familias rurales y periurbanas de México? REDVET. Rev. Electrónico. Veterinario. 11, 1-15.
- Velásquez, 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

- Venkata Subhash, G., Chugh, N., Iyer, S., Waghmare, A., Musale, A. S., Nandru, R., Bajpai Dixit, R., Gaikwad, M. S., Menón, D., Thorat, R., Raja Krishna Kumar, G., Nagle, V., Sagaram, U. S., and Dasgupta, S. (2020). Application of in vitro protein solubility for selection of microalgae biomass as protein ingredient in animal and aquafeed. *Journal of Applied Phycology*, 32, 3955-3970. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02235-9>
- Wang, M. & Lu, M. (2015). Tilapia polyculture: a global review. *Aquaculture research*, 47(8), 2363-2374. <https://doi.org/10.1111/are.12708>
- <sup>a</sup>Wang, P., Zhu, J., Feng, J., He, J., Lou, Y., and Zhou, Q. (2017). Effects of dietary soy protein concentrate meal on growth, immunity, enzyme activity and protein metabolism in relation to gene expression in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, 477, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.030>
- Wang, T., Osho, S. O., & Adeola, O. (2018). Additivity of apparent and standardized ileal digestibility of amino acid determined by chromic oxide and titanium dioxide in mixed diets containing wheat and multiple protein sources fed to growing pigs. *Journal of Animal Science*, 96(11), 4731-4742. <https://doi.org/10.1093/jas/sky326>
- <sup>b</sup>Wang, Y. R., Wang, L., Zhang, C. X., & Song, K. (2017). Effects of substituting fishmeal with soybean meal on growth performance and intestinal morphology in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture Reports*, 5, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.12.005>
- Waweru, J., Raburu, P., & Odhiambo, E. (2019). Gonad Histology, Proximate Composition and Growth Efficiency of Nile Tilapia Fed with Pawpaw (*Carica papaya*) seed powder. <http://41.89.164.27:8080/xmlui/handle/123456789/611>
- Wilce, M. C., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular*
- Wilson, K. B., & Altenritter, M. E. (2024). A multi-metric approach to characterize

- variability in Yellow Perch (*Perca flavescens*) use of Lake Ontario and two barrier-protected coastal wetlands. *Environmental Biology of Fishes*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10641-024-01552-z>
- Wu, L., Li, X., Zhou, J., Qi, T., Li, Y., Song, X., Song, Z., and Li, X. (2025). Phosphate perils in marine aquaculture: Systematic toxicity assessment in turbot juveniles in cultivation. *Journal of Environmental Sciences*, 156, 619–631. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2024.10.005>
- Wu, Y., Wang, B., Tang, L., Zhou, Y., Wang, Q., Gong, L., Ni, J. and Li, W. (2022). Probiotic *Bacillus* alleviates oxidative stress-induced liver injury by modulating gut-liver axis in a rat model. *Antioxidants*, 11(2), 291. <https://doi.org/10.3390/antiox11020291>
- Xia, B., Gao, Q. F., Li, H., Dong, S. L., and Wang, F. (2013). Turnover and fractionation of nitrogen stable isotope in tissues of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture Environment Interactions*, 3(2), 177-186. <https://doi.org/10.3354/aei00061>
- Xie, M., Xie, Y., Li, Y., Zhou, W., Zhang, Z., Yang, Y., Olsenic, R., E. and Zhou, Z. (2021). The effects of fish meal replacement with ultra-micro ground mixed plant proteins (uPP) in practical diet on growth, gut and liver health of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture reports*, 19, 100558. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100558>
- Xiong, J. B., Nie, L., and Chen, J. (2019). Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity. *Zoological research*, 40(2), 70. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.069
- Xiong, W., Guo, C., Gozlan, R. E., & Liu, J. (2022). Tilapia introduction in China: Economic boom in aquaculture versus ecological threats to ecosystems. *Reviews in Aquaculture*, 15(1), 179-197. <https://doi.org/10.1111/raq.12710>
- Xochipa Hernández, L. I. (2023). 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*) (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Xu, B., Liu, Y., Chen, K., Wang, L., Sagada, G., Tegomo, A. F., Yang, Y., Sun, Y., Zheng, L., Ullah, S., and 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>
- Yan, J., Li, J., Xue, Q., Xie, S., Jiang, J., Li, P., and Du, B. (2022). *Bacillus* sp. DU-106 ameliorates type 2 diabetes by modulating gut microbiota in high-fat-fed and streptozotocin-induced mice. *Journal of Applied Microbiology*, 133(5), 3126-3138. <https://doi.org/10.1111/jam.15773>
- Yones, A. M. M., & Metwalli, A. A. (2015). Effects of fish meal substitution with poultry by-product meal on growth performance, nutrients utilization and blood contents of juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 7(1), 1000389. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000389>
- Yoshida, G. M., Oliveira, C. A. L. D., Kunita, N. M., Rizzato, G. S., and Ribeiro, R. P. (2015). Reproduction performance of female Nile tilapia under different environments and age classes. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37(3), 221-226. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v37i3.25907>
- Yossa, R., Greiling, A. M., Basiita, R. K., Sakala, M. E., Baumgartner, W. A., Taylor, A., & Gatlin III, D. M. (2021). Replacing fishmeal with a single cell protein feedstuff in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* diets. *Animal Feed Science and Technology*, 281, 115089. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115089>
- Yostawonkul, A., Javed, G. A., Javed, S., and Arshad, N. (2022). *Levilactobacillus brevis* from carnivores can ameliorate hypercholesterolemia: In vitro and in vivo mechanistic evidence. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 1725-1742. <https://doi.org/10.1111/jam.15678>

- Yostawonkul, J., Kamble, M. T., Sakuna, K., Madyod, S., Sukkarun, P., Medhe, S. V., Channarong, R., Pirarat, N. and Sewaka, M. (2023). Effects of Mangosteen (*Garcinia mangostana*) peel extract loaded in nanoemulsion on growth performance, immune response, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas veronii* infection. *Animals*, 13(11), 1798. <https://doi.org/10.3390/ani13111798>
- Yousif, R. A., Abdullah, O. J., Ahmed, A. M., Adam, M. I., Ahmed, F. A. M., and Idam, O. A. (2019). Effect of replacing fishmeal with water spinach (*Ipomoea aquatica*) on growth, feed conversion and carcass composition for Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*). *J Aquat Sci Mar Biol*, 2(4), 3-20. <https://doi.org/10.22259/2638-5481.0204003>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B. A., and Arockiaraj, J. (2020). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1903-1927. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>
- Zainuddin, M., Pringgenies, D., Radjasa, O. K., Haeruddin, H., Sabdaningsih, A., and Herawati, V. E. (2022). Optimasi pH Dan Salinitas Media Kultur Terhadap Pertumbuhan Dan Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri *Bacillus Firmus* Dari Ekosistem Padang Lamun Nusa Lembongan–Bali. *Journal of Tropical Marine Science*, 5(2), 140-148. <https://doi.org/10.33019/jour.trop.mar.sci.v5i2.2862>
- Zapata, D. B., Lazo, J. P., Herzka, S. Z., & Viana, M. T. (2014). The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. *Aquaculture Research*, 47(6), 1778-1789. <https://doi.org/10.1111/are.12636>
- Zhang, C., Rahimnejad, S., Wang, Y. R., Lu, K., Song, K., Wang, L., and Mai, K. (2018). Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. *Aquaculture*, 483, 173-182.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.029>

- Zhang, J., Yu, M., Wang, J., Longshaw, M., Song, K., Wang, L., Li, X., Zhang, C., and Lu, K. (2023). La harina de bacterias metanótrofas (*Methylococcus capsulatus*, Bath) alivia la enteritis inducida por harina de soja en la lubina moteada (*Lateolabrax maculatus*) al modular las respuestas inmunitarias y la flora intestinal. *Aquaculture*, 575, 739795. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739795>
- Zhang, Q., Liang, H., Longshaw, M., Wang, J., Ge, X., Zhu, J., Li, S., and Ren, M. (2022). Effects of replacing fishmeal with methanotroph (*Methylococcus capsulatus*, Bath) bacteria meal (FeedKind®) on growth and intestinal health status of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Fish and Shellfish Immunology*, 122, 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.734901>
- Zheng, J., Zhang, W., Dan, Z., Cao, X., Cui, K., Zhu, S., Zhuang, Y., Mai, K., & Ai, Q. (2023). Effects of fish meal replaced by methanotroph bacteria meal (*Methylococcus capsulatus*) on growth, body composition, antioxidant capacity, amino acids transporters and protein metabolism of turbot juveniles (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 562, 738782. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738782>
- Zhou, H., & 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. <https://doi.org/10.1111/anu.13091>
- Zhou, H., Chen, G., Gu, B., & Lin, X. (2014). Relative contribution of alternative proteins to the growth of Juvenile Cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 47(5), 1639-1651. <https://doi.org/10.1111/are.12625>
- Zlaugotne, B., Pubule, J., & Blumberga, D. (2022). Advantages and disadvantages of using more sustainable ingredients in fish feed. *Heliyon*, 8(9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10527>