



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA TILAPIA *Oreochromis niloticus* CULTIVADA EN UN SISTEMA HIPERINTENSIVO DE BIOFLOC QUIMIOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO Y SUMINISTRADO CON MICROALGAS.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

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

P r e s e n t a

Janeth Merín Guzmán

La Paz, Baja California Sur, enero de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día Jueves 19 del Mes de Diciembre del 2022, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA TILAPIA *Oreochromis niloticus* CULTIVADA EN UN SISTEMA HIPERINTENSIVO DE BIOFLOC QUIMIOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO Y SUMINISTRADO CON MICROALGAS.

Presentada por el alumno:

Janeth Merín Guzmán

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

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

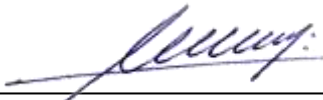
LA COMISIÓN REVISORA



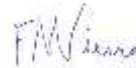
Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Director /Co-Director de Tesis



Dra. Paola Magallón Servín
Co-Director/Co -Tutor



Dr. Daríel Tovar Ramírez
Co-Tutor



Dr. Felipe do Nascimento Vieira
Co -Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado
y Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 12 de diciembre de 2022.

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

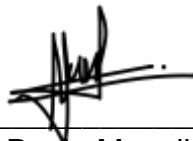
- Herramienta antiplagio:
Ithenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas, Excluir bibliografía
- Porcentajes de similitud:
-20%

		Citas excluidas	20%
		Bibliografía excluida	SIMILAR
Resumen de Coincidencias			
1	Internet 1134 palabras Copiado el 15-Oct-2022 cibnor.repositorioinstitucional.mx		9%
2	Internet 107 palabras www2.colciencias.gov.co		1%
3	Internet 55 palabras Copiado el 18-Jul-2020 tesis.ipn.mx		<1%
4	Internet 52 palabras Copiado el 17-Abr-2018 repositorio.lamolina.edu.pe		<1%
5	Internet 44 palabras Copiado el 03-Nov-2022 repositorio.xoc.uam.mx		<1%
6	Internet 43 palabras Copiado el 01-May-2021 www.veterinariadigital.com		<1%
7	Internet 33 palabras Copiado el 03-Abr-2019 eprints.uanl.mx		<1%

Firmas del comité



Dra. Norma A. Estrada M.



Dra. Paola Magallón Servín
Ramírez



Dr. Dariel Tovar



Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Paola Magallón Servín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor de Tesis

Dr. Felipe do Nascimento Vieira
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Dra. Paola Magallón Servín
Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Jurado de Examen

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Dra. Paola Magallón Servín
Dr. Dariel Tovar Ramírez

Suplente

Dr. Deneb Maldonado García

Resumen

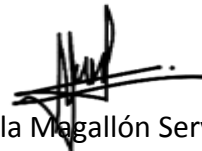
La Tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, ocupa el segundo lugar a nivel mundial de producción dulceacuícola. El sistema de biofloc (TBF) es una tecnología amigable con el ambiente, que se caracteriza por el reciclaje de alimento no consumido y los desechos producidos por los organismos en forma de flóculos, en este sistema, el recambio de agua es mínimo y existe una gran densidad de animales por unidad de área. El TBF es considerado como una estrategia para el control de enfermedades, con diversos compuestos bioactivos presentes en los flóculos a los cuales se les atribuye un papel importante en el desarrollo y estimulación del sistema inmunológico de los peces. Los peces teleosteos poseen un sistema inmune capaces de llevar a cabo respuestas humorales y celulares tanto innatas como específicas, donde el plasma de la sangre forma parte de los principales indicadores de salud del organismo. El objetivo fue determinar la respuesta inmunológica en plasma sanguíneo de *O. niloticus* cultivada en sistemas hiperintensivos de TBF. Se llevaron a cabo 5 tratamientos: 1) TBF heterotrófico (control); 2) TBF quimiotrófico; 3) TBF suministrado con *Chlorella sp*; 4) TBF suministrado con *Chlorella sorokiniana 2714*; y 5) TBF suministrado con *Chlorella sorokiniana 2805*. A las 40 semanas de comenzado el experimento se extrajo la sangre vía punción de la vena caudal y se centrifugó para obtener el plasma. Se analizó la actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD), antiproteasa, proteasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa mediante espectrofotometría, se evaluó también la capacidad bactericida del plasma con una cinética de crecimiento de bacterias patógenas del género *Exiguobacterium*. Los resultados muestran que la enzima antiproteasa presentó una diferencia significativa en el BFT quimiotrófico comparado con el control. Asimismo, los sistemas TBF suministrados con *Chlorella sp* y *C. sorokiniana* presentan una diferencia significativa de la enzima SOD con respecto al control y al TBF quimiotrófico. Con estos resultados se beneficia directamente al rendimiento productivo de los peces en el sistema, lo que nos indica que los microorganismos incluyendo a las microalgas en los sistemas de cultivo de biofloc son una fuente importante de compuestos bioactivos que estimulan el sistema inmune en *O. niloticus*.

Palabras claves: tecnología biofloc (TBF), respuesta inmune, plasma, tilapia, enzimas
ORCID 0000-0003-0142-1520

Vo. Bo. Co-Directoradas de Tesis



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz



Dra. Paola Magallón Servín

Summary

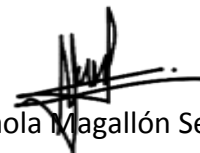
Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, is the second freshwater fish with the largest production worldwide. Biofloc technology (BFT) is characterized by the recycling of feed and waste produced by the organisms into the flocs, a minimal exchange of water, and its reduction of water and space as compared with other rearing technologies. In addition, BFT is considered a strategy for disease control, with various bioactive compounds present in the flocs (flocculated organic matter in addition to microorganisms), which have an important role in the development and stimulation of fish's immune system. Teleost fish have an immune system capable of carrying out both innate and specific humoral and cellular responses, blood plasma is one of the main indicators of this system. This project aimed to determine the immunological response in the blood plasma of *O. niloticus* cultured in BFT hyperintensive systems with different microbial management. Five treatments were established: 1) heterotrophic BFT (control); 2) chemotrophic BFT; 3) BFT with *Chlorella sp*; 4) BFT with *Chlorella sorokiniana* 2714, and 5) BFT with *Chlorella sorokiniana* 2805. After 40 weeks of the experiment, blood was extracted from the caudal vein and centrifuged to obtain plasma. The enzymatic activity was measured by superoxide dismutase (SOD), antiprotease, protease, alkaline phosphatase, and peroxidase. All of them were analyzed by spectrophotometry, as well as the bactericidal capacity of the genus *Exiguobacterium*. The results showed that the antiprotease enzyme had a significant difference in the chemotrophic BFT compared to the control. Likewise, the BFT systems with *Chlorella sp* and *C. sorokiniana* had a significant difference in the SOD enzyme with respect to the control and the chemotrophic BFT. This directly benefits the productive performance of the fish in the system, indicating that microorganisms including microalgae in biofloc culture systems are an important source of bioactive compounds that stimulate the immune system in *O. niloticus*.

Keywords: Biofloc technology (BFT), immune response, plasma, tilapia, enzymes
ORCID 0000-0003-0142-1520

Vo. Bo. Co-Directoradas de Tesis



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz



Dra. Paola Magallón Servín

Dedicatoria

A mis Papás y hermanos que son todo para mí.

A mí corazón de alma, mente y cuerpo.

A mí sobrino que está en el cielo.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por ser el receptor de mi estudio de Posgrado.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología por la beca recibida (No. becario 1086599), durante mi Posgrado.

Le doy gracias a Dios por darme vida, por ser el que impulsa cada paso de mi vida, por amarme sobre todas las cosas siendo que todo es por él y para él (Colosenses 1:16).

A mis Padres Jaime Merín Carranza y Eva L. Guzmán Ortiz, que me han apoyado todo este camino de vida, gracias por motivarme a ser una mejor versión de mi día con día y seguir adelante a pesar de las adversidades. A mis hermanos Diana y Jaime por ser mis compañeros de vida, por estar presentes en los momentos de esfuerzo y alegrarme los días.

Igualmente agradezco profundamente a la Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz y Dra. Paola Magallón Servín, por su paciencia, dedicación y apoyo, haciéndome una más de sus estudiantes y compartirme su conocimiento en un campo diferente a la biología. De igual forma gracias al Dr. Dariel Tovar por abrirme las puertas de su laboratorio, mi admiración para su persona como profesor y profesionalista por ser de gran apoyo en este proyecto. Al Dr. Felipe Viera Do Nacimiento por apoyarme en momentos de duda.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional gracias por su apoyo y presencia en momentos de incertidumbre. Por enseñarme cada uno de ustedes, una manera más sencilla de ver las cosas. Gracias a mis amistades de la Maestría, por apoyarme cada vez que quería desistir, por enseñarme a tener momentos inolvidables.

Por último, quiero agradecer a mi persona, por esforzarme día con día a pesar de querer desistir en momentos de angustia, por ser paciente y no derrumbarme por cada intento no satisfactorio. ¡Solo queda decir Gracias Janeth, lo lograste!

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
Abreviaturas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estado actual de la Acuicultura	1
1.2 Tilapia del Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	1
1.2.1 Clasificación Taxonómica	1
1.2.2 Características biológicas	2
1.3 Cultivo de <i>Oreochromis niloticus</i>	3
1.4 Tecnología biofloc (TBF)	4
1.4.1 Sistema TBF heterotrófico	6
1.4.2 Sistema TBF quimioautotrófico	7
1.4.3 Sistema TBF fotoautotrófico	8
1.4.4 Salud de organismos cultivados con TBF	8
1.5 Respuesta inmune en peces teleósteos	9
1.5.1 Plasma sanguíneo	10
1.5.2 Fosfatasa alcalina	11
1.5.3 Proteasa y antiproteasa	11
1.5.4 Enzimas antioxidantes	12
1.5.4.1 Superóxido dismutasa	12
1.5.4.2 Peroxidasa	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Cultivo de <i>Oreochromis niloticus</i> con tecnología biofloc	14
2.2 Sistemas integrados de TBF con implementación de microalgas	16
2.3 Respuesta inmune en <i>Oreochromis niloticus</i> cultivada en TBF	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos específicos	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Diseño experimental	21
6.2 Tratamientos con Biofloc	22
6.2.1 Tratamiento heterotrófico (T1)	22
6.2.2 Tratamiento quimiotrófico (T2)	23
6.2.3 Tratamientos fotoautotróficos (T3-T5)	23

6.3 Actividad enzimática. Respuesta inmune humoral.....	23
6.3.1 Cuantificación de proteínas (Bradford, 1976).....	24
6.3.2 Actividad antiproteasa	24
6.3.3 Actividad proteasa.....	25
6.3.4 Determinación de la fosfatasa alcalina	25
6.3.5 Superóxido dismutasa	26
6.3.6 Peroxidasa (TMB)	27
6.4 Inhibición del crecimiento bacteriano	27
6.5 Análisis estadísticos.....	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Actividad antiproteasa y proteasa	29
7.2 Determinación de la fosfatasa alcalina	30
7.3 Enzimas antioxidantes.....	31
7.4 Inhibición de crecimiento bacteriano	33
8. DISCUSIÓN	35
8.1 Respuesta humoral no específica.....	35
8.2 Enzimas antioxidantes.....	35
8.3 Inhibición del crecimiento bacteriano	37
9. CONCLUSIONES	38
10. LITERATURA CITADA	39

Lista de figuras

Figura 1. Anatomía externa de <i>Oreochromis niloticus</i>	3
Figura 2. Ciclo de asimilación del nitrógeno de los sistemas integrados con tecnología biofloc.	6
Figura 3. Diseño experimental T1) biofloc heterotrófico; T2) biofloc quimiotrófico; biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: T3) <i>Chlorella</i> spp, T4) <i>Chlorella sorokiniana</i> -2714 y T5) <i>Chlorella sorokiniana</i> -2805.	22
Figura 4. Actividad antiproteasa (% de la capacidad inhibitoria de la tripsina) del plasma de <i>O. niloticus</i> cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: <i>Chlorella sorokiniana</i> -2805 (CN), <i>Chlorella sorokiniana</i> -2714 (CS) y <i>Chlorella</i> spp (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los tratamientos ($P < 0.05$).	29
Figura 5. Actividad proteasa (U/mg de proteína) del plasma de <i>O. niloticus</i> cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: <i>Chlorella sorokiniana</i> -2805 (CN), <i>Chlorella sorokiniana</i> -2714 (CS) y <i>Chlorella</i> spp (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los distintos tratamientos.	30
Figura 6. Actividad fosfatasa alcalina (U/mg de proteína) del plasma de <i>O. niloticus</i> cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: <i>Chlorella sorokiniana</i> -2805 (CN), <i>Chlorella sorokiniana</i> -2714 (CS) y <i>Chlorella</i> spp (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los distintos tratamientos.	31
Figura 7. Actividad superóxido dismutasa (SOD; U/mg de proteína) del plasma de <i>O. niloticus</i> cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: <i>Chlorella sorokiniana</i> -2805 (CN), <i>Chlorella sorokiniana</i> -2714 (CS) y <i>Chlorella</i> spp (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los tratamientos ($P < 0.05$).	32
Figura 8. Actividad antioxidante peroxidasa (U/mg de proteína) del plasma de <i>O. niloticus</i> cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: <i>Chlorella sorokiniana</i> -2805 (CN), <i>Chlorella sorokiniana</i> -2714 (CS) y <i>Chlorella</i> spp (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los distintos tratamientos.	33
Figura 9. Efecto bactericida (% Inhibición del crecimiento bacteriano) del plasma de <i>O. niloticus</i> cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: <i>Chlorella</i>	

sorokiniana-2805 (CN), Chlorella sorokiniana-2714 (CS) y Chlorella spp (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los distintos tratamientos.....34

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Tilapia de Nilo	2
--	----------

Abreviaturas

μl	Microlitro
°C	Grados Celsius
ANOVA	Análisis de varianza
C	Carbono
C:N	Relación carbono nitrógeno
C₆H₁₂O₆	Glucosa
CO₂	Dióxido de carbono
DB	Desarrollo bacteriano
g	Gramo
h	Hora
kg	Kilogramo
l	Litro
m	Metro
M	Molar
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
O₂	Oxígeno
org	Organismo
pH	Potencial de hidrogeno
RAS	Sistema de recirculación acuícola
TBF	Tecnología Biofloc
s	Segundo
SOD	Superóxido Dismutasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estado actual de la Acuicultura

Durante los últimos 10 años la población mundial se ha ido acercando a los 10,000 millones de personas, por lo que es inevitable no enfrentarnos un número considerable de personas malnutridas (Avnimelech, 2011). En consecuencia, la demanda por alimentos de origen acuático ha incrementado, sin embargo, a pesar de que la pesca es indispensable para abastecer esta solicitud, es necesario incluir prácticas innovadoras como lo es la acuicultura, cuyo potencial ha sido evidente desde el desarrollo de los diferentes sistemas como la implementación de las densidades de cultivos en sistemas intensivos e hiperintensivo, con el fin de colaborar en mantener la seguridad alimentaria mundial (Avnimelech, 2007).

La acuicultura ha presentado desde 1970 un crecimiento del 7.5% anual, más rápido que cualquier otro cultivo de producción animal, con más de 600 diferentes especies de cultivo de ambientes salobres, dulceacuícolas y marinos (Crab *et al.*, 2012). Es una de las prácticas con mayor rendimiento productivo y capacidad de crecimiento, encargada de producir más del 60% del pescado que se consume a nivel global. Entre las especies con mayor volumen de producción está la Tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* ocupando el segundo lugar a nivel mundial de producción dulce acuícola, sin embargo, la producción de peces dulceacuícolas compromete los recursos ambientales y ecosistemas asociados (Ferreira *et al.*, 2011; FAO, 2016).

1.2 Tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*

1.2.1 Clasificación Taxonómica

La Tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, se registró por primera vez hace 4000 años en los relieves artesanales por debajo de una tumba en Egipto junto con otros peces ornamentales (Pérez *et al.*, 2015). Es un actinopterigio perteneciente a la familia Cichlidae, especie tropical de agua dulce originalmente del continente africano que se distribuyó principalmente alrededor del mundo en las décadas de los 60s y 80s. Fue descrita por primera vez en 1758 por Linnaeus, la posición taxonómica actual se muestra a continuación en la Tabla 1 (Zapata *et al.*, 2017):

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Tilapia de Nilo

Reino: Animalia
Filo: Chordata
Clase: Actinopterygii
Subclase: Neopterygii
Infraclase: Teleostei
Superorden: Acanthopterygii
Orden: Perciformes
Familia: Cichlidae
Género: <i>Oreochromis</i>
Especie: <i>Oreochromis niloticus</i>

1.2.2 Características biológicas

En ambientes naturales habitan en aguas dulces principalmente someras, turbias y lodosas preferentemente al fondo de lagunas, lagos y ríos, inclusive pueden llegar a vivir en aguas marinas ya que toleran altas salinidades (0-40 ppm), es decir son peces eurihalinos, tienen la capacidad de vivir en ambos ecosistemas (Pérez *et al.*, 2015). La anatomía externa de la tilapia (Fig. 1) se compone de un cuerpo comprimido, tamaño estándar de 60 cm de largo. El dorso es de color grisáceo, rosado- rojizo de los lados y con líneas verticales oscuras en la aleta caudal trunca. Presenta escamas cicloideas, 16-17 espinas rígidas y blandas continuas con 11-15 rayos en la aleta dorsal con numerosas líneas negras. La aleta anal tiene 3 espinas y 10-12 rayos. El primer arco branquial presenta 27-33 filamentos branquiales. Es una especie omnívora que en las primeras etapas de crecimiento se alimenta principalmente de zooplancton, materia en suspensión y fitoplancton. Una vez que comienzan a crecer más de 5 cm, la especie se vuelve herbívora alimentándose primordialmente de fitoplancton, sin embargo, pueden llegar a tener hábitos carnívoros o detritívoros (Hurtado, 2005; Pérez *et al.*, 2015). La tilapia del Nilo presenta una alimentación diurna.



Figura 1. Anatomía externa de *Oreochromis niloticus*

El ciclo de vida de la especie comienza una vez que el embrión empieza a desarrollarse después de la fecundación. En condiciones adecuadas, los organismos alcanzan la madurez sexual a partir de los tres meses, a partir de esta edad los machos realizan un nido circular en el fondo del estanque con el movimiento de su aleta caudal (Saavedra, 2006; Pérez. *et al.*, 2015). Acto seguido, ocurre la fecundación, el macho fecunda los huevos y al terminar la hembra los colecta con su boca para comenzar el proceso de incubación, después de varias semanas los embriones ejercen movimientos rotatorios antes de la eclosión (Galvez, 2001).

Una vez que el huevo eclosiona comienza la etapa de alevín con tamaños de 0.5- 1cm, la cual dura aproximadamente 5 días. Poseen un saco vitelino en la parte ventral del cuerpo. El crecimiento va a depender de las condiciones ambientales. Cuando *O. niloticus* alcanza una talla de más de 3 cm se considera cría, después a los 10 cm se les denomina juveniles y a los 20 cm pasan a ser adultos (Saavedra, 2006).

1.3 Cultivo de *Oreochromis niloticus*

El cultivo de *O. niloticus* en México se inició en 1964 con la importación procedente de los Estados Unidos Americanos, distintos ejemplares de Tilapia fueron depositados en las granjas de Oaxaca (FAO, 2021). En la actualidad se encuentran en operación 17 centros acuícolas productoras de Tilapia, además se cultiva en todas las entidades federativas excepto

Aguascalientes y la Ciudad de México, siendo Chiapas, Tabasco, Guerrero, Estado de México y Veracruz los mayores productores (INAPESCA, 2018). Sin embargo, su cultivo se ha ido expandiendo a otras partes del norte del país.

En México los cultivos se dividen en sistemas extensivos, semi-extensivos, intensivos e hiperintensivo, los cuales están presentes en las zonas cercanas a una fuente de agua natural. Los cultivos se diferencian por el manejo que se le da al cultivo, la densidad de siembra, la tasa de alimentación, la calidad de agua y tipo de alimento que se emplea, así como su porcentaje de proteína (INAPESCA, 2018). Los extensivos se desarrollan en espacios grandes, sin control de parámetros, sin o con muy escasa adición de alimento balanceado. Llegan alcanzar <1,000 kg/ha de producción, esto debido a que la desventaja de este tipo de cultivos es la producción de alga por la descomposición de la materia orgánica (Avnimelech, 2009). El factor limitante para generar mayores kilogramos de producción es la cantidad de carbono consumida por las microalgas. Los sistemas intensivos e hiperintensivos, se caracterizan por la dependencia de alimento balanceado, aireación, control de parámetros fisicoquímicos, así como el reciclaje de agua. Los niveles de siembra que manejan estos cultivos van a partir de 25 kg/m³ para los intensivos y de 30 organismos/ m³ para los hiperintensivos. El manejo de los cultivos es el factor determinante para obtener una buena cosecha, ya que dependen totalmente de regular los parámetros fisicoquímicos del agua y la oxigenación. Este tipo de cultivos suelen ser experimentales, por lo que comúnmente se cultiva el camarón, la tilapia y la trucha (Sorhouet, 2015).

1.4 Tecnología biofloc (TBF)

El desarrollo de la tecnología biofloc (TBF) es una alternativa para los cultivos intensivos, los cuales permiten un mejor control de los sistemas acuícolas. Esta tecnología permite cultivar organismos acuáticos en estanques controlados con un ambiente dominado por microorganismos. A mediados de los 90's, Steve Hopkins y Avnimelech (Avnimelech, 2006) con su equipo de trabajo comenzaron de manera científica y práctica los cultivos con TBF, en ambos proyectos se utilizó el mínimo o nulo recambio de agua del sistema. Permitiendo a las

comunidades microbianas degradar, asimilar y nitrificar el amonio, asemejándose a los biofiltros utilizados en los sistemas de recirculación (RAS) (Avnimelech, 2006, 2009). El establecimiento de los sistemas TBF se dio en consecuencia al desarrollo de estanques con aireación y recirculación permanentemente que daban como resultado procesos microbianos beneficiosos para los organismos, además de encontrar una alternativa a las restricciones del agua y sus altos costos, siendo la TBF una opción biosegura y sustentable (Avnimelech, 2009). Los sistemas TBF presentan una restricción del intercambio de agua y alta oxigenación, con el fin de formar flóculos. Estos últimos son agregados del alimento balanceado, excretas, bacterias, microalgas, nemátodos, protozoarios y MOP, unidos por una matriz de polisacáridos y atracciones electrostáticas. La matriz es de forma irregular, permeable, porosa y fina (Hargreaves, 2013; Fernandes, 2020).

La tecnología de biofloculación comienza a partir del alimento balanceado que se administra a los organismos, donde solo el 30% de los nutrientes es asimilado, y el resto se descompone de manera natural a nitrógeno amoniacal, el cual, al estar presente en agua residual, está en forma de iones de amonio, los cuales son aprovechados por microorganismos como las bacterias heterotróficas, bacterias fotoautotróficas, bacterias quimotróficas o bien microalgas (Pérez *et al.*, 2014). Estos procesos dependen de la relación de carbono: nitrógeno del agua, la cual se regula a partir del monitoreo del agua y la fuente de carbono añadida, comúnmente es melaza o azúcar refinada, sin embargo, en ocasiones se ha utilizado café y los desechos de la malta originaria de la producción de cerveza (Avnimelech, 2009). El objetivo del sistema biofloc es optimizar la calidad de agua y reciclamiento de nutrientes a partir de los microorganismos presentes en los flóculos. En la Fig. 2 se muestra el ciclo de asimilación del amonio en el sistema con TBF quimiotrófico por medio de bacterias nitrificantes *Nitrosomonas sp* y *Nitrobacter sp* (Schramm *et al.*, 1999).

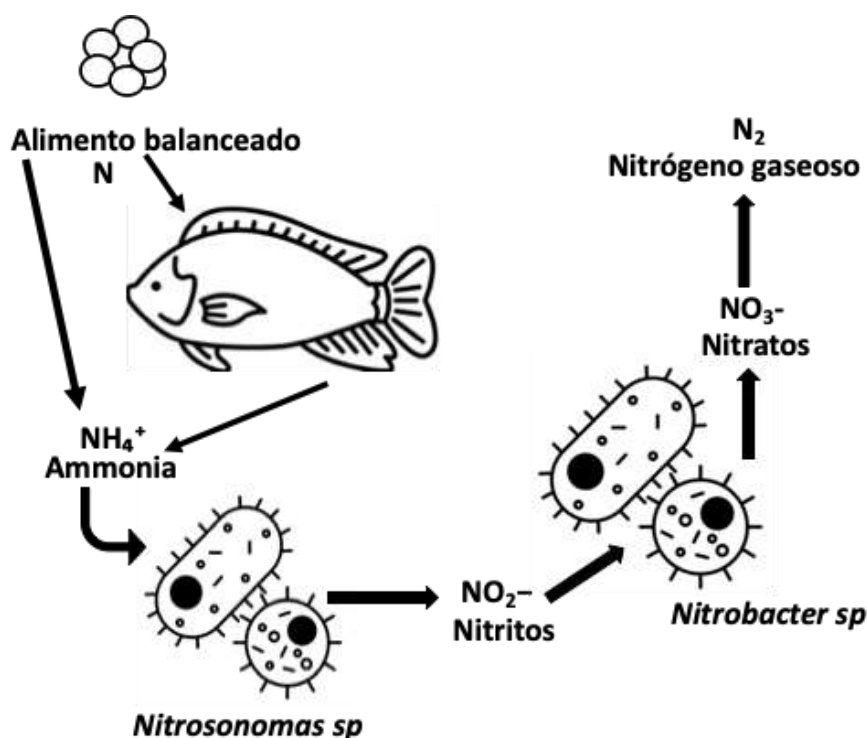
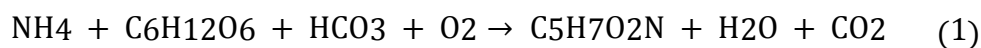


Figura 2. Ciclo de asimilación del nitrógeno de los sistemas integrados con tecnología biofloc.

1.4.1 Sistema TBF heterotrófico

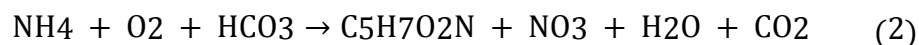
Los sistemas integrados con TBF trabajan de manera conjunta a distintos niveles tróficos. Para poder asimilar el amonio contenido en el agua existen tres vías que utilizan, sin embargo, se puede manejar para tener una vía dominante. La primera vía es la ruta heterotrófica consiste en la dominancia de bacterias heterotróficas, que dependen de la fuente de carbono añadida y altas cantidades de oxígeno (Avnimelech, 2009). La conversión de amonio a nitrógeno consiste en aumentar el radio de carbono:nitrógeno (C:N) con una fuente de carbono, provocando un entorno favorable para divergir la comunidad microbiana de un ambiente rico en microalgas y microorganismos potencialmente patógenos a una mayor representación de bacterias heterotróficas. Algo a destacar de estas bacterias es que convierten el nitrógeno en biomasa consumible. La transformación del amonio a esta biomasa microbiana se lleva a cabo de la siguiente manera (Collazos y Arias, 2015):



Dando como resultado que, para degradar 1 g de amonio presente en el agua, es necesario añadir 15- 20 g de hidratos de carbono (20:1) con base a la relación de C:N. Además, que para que se encuentre un balance en esta reacción es necesario consumir 4.7 g de oxígeno (Collazos y Arias, 2015), por lo que una de las diferencias principales, es el alto consumo de oxígeno, son más activos en la oscuridad o poca luz a comparación de los sistemas integrados con microalgas.

1.4.2 Sistema TBF quimioautotrófico

Anteriormente se ha mencionado que existen diferentes rutas metabólicas para eliminar el nitrógeno en forma de iones de amonio del agua de los cultivos. La vía quimioautófica, se caracteriza porque no elimina el nitrógeno del agua, sino que consiste en transformar el amonio tóxico (NH_4) en nitratos (NO_3^-) por medio de microorganismos removedores de amonio conocidos como bacterias nitrificantes que organizan y realizan todo el proceso de nitrificación (Dauda, 2019). El NH_4 se transforma en nitritos (NO_2^-) por medio de bacterias del género *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* entre otras y posteriormente los NO_2^- en NO_3^- por medio de bacterias como las *Nitrobacter* (Fig. 2) (Schramm *et al.*, 1999). Finalmente, el NO_3^- se transforma a través de reacciones aeróbicas por desnitrificación, en nitrógeno atmosférico (N_2). En la siguiente ecuación se define cómo es que sucede esta reacción (Collazos y Arias, 2015):



Indicando que, para degradar 1 g de amonio presente en el agua, es necesario que se encuentre un balance en esta reacción siendo necesario consumir 4.2 g de oxígeno (Collazos y Arias, 2015), por lo que una de las características principales, es el alto consumo de oxígeno disuelto. Su energía la consumen de carbono inorgánico y son más activos en la oscuridad o poca luz, ya que no necesitan el proceso de fotosíntesis. El sistema TBF quimiotrófico se asemeja al papel que juegan los biofilms dentro de los sistemas RAS en la acuicultura, estas bacterias son autótrofas porque consumen principalmente el CO_2 y aeróbicas ya que necesitan del oxígeno para crecer, aunque el sistema quimiotrófico sea el dominante en un biofloc, se necesitan las bacterias heterotróficas especialmente en los primeros 30 días del cultivo, ya que toma

aproximadamente de dos a cuatro semanas establecer el proceso de nitrificación. Entre las diferencias con el sistema heterotrófico, el uso del sistema nitrificante reduce la producción de sólidos y se vuelve más estable, sin embargo, genera menos biomasa microbiana a pesar de consumir cantidades de oxígeno similares (Ferreira *et al.*, 2021; Corrêa da Silva *et al.*, 2022).

1.4.3 Sistema TBF fotoautotrófico

La TBF integrada con un sistema fotoautotrófico o conocido como ABFT por sus siglas en inglés consiste en un cultivo dominado por microalgas. El biofloc verde (suministrado por microalga debido a la estimulación del proceso de fotosíntesis) remueve el amonio del agua residual con mayor rapidez por medio de la fotosíntesis producida por el fitoplancton. Esta ruta de remoción del amonio ocurre solo en presencia de luz, por lo que constantemente presenta variaciones de algunos parámetros fisicoquímicos, tales como el del agua como el pH, oxígeno disuelto y amonio (Dauda, 2019). Las principales características de esta vía autotrófica son que requiere una menor demanda de oxígeno y la relación de C:N no debe de ser excesiva para continuar con un crecimiento óptimo a comparación de los otros sistemas. La relación de microalgas y bacterias en un cultivo de biofloc debe estar estrictamente equilibrado y bien manejado cuando se decide generar dominancia. En el caso de las microalgas producen carbono orgánico, que pudieran beneficiar a las bacterias heterotróficas, además son de vida corta, por lo que al terminar su ciclo de vida pueden estar presentes en el agua en forma de carbono orgánico generando un ambiente propicio para el crecimiento de las bacterias heterotróficas. De ahí viene que, aunque un sistema tenga dominancia siempre estarán presentes las otras bacterias (Hargreaves, 2006).

1.4.4 Salud de organismos cultivados con TBF

La salud animal es una de las principales características que se debe optimizar para tener un desempeño productivo del cultivo. En términos veterinarios y de producción acuícola con base a la observación, se ha definido a la salud como el estado donde el organismo tiene funcionamiento y comportamiento óptimo, con ausencia de enfermedades; Además de

presentar la mayor productividad del cultivo que este se mide por medio crecimiento y supervivencia (Ducrot *et al.*, 2011; Fimbres *et al.*, 2019).

La TBF es una vía emergente en nutrición y salud animal, se ha documentado la posibilidad de que el biofloc mejore la respuesta inmune innata por medio de inmunoestimulantes provenientes de la pared celular de las bacterias presentes en los flocs que combaten contra patógenos infecciosos (Kumar *et al.*, 2021). Las bacterias presentes en sistemas de cultivo con TBF acumulan polihidroxibutirato el cual aumenta el crecimiento, digestión, peso y supervivencia del hospedero. Una de las suposiciones sobre la estimulación al sistema inmune por el uso de la TBF comienza por microbiota intestinal de los organismos cultivados con este manejo, que propician la presencia de múltiples enzimas digestivas, que mejoran la absorción de los alimentos (Kuhn *et al.*, 2009; Balcázar *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2010; Wang, 2007; Liu *et al.*, 2009).

1.5 Respuesta inmune en peces teleósteos

Los peces teleósteos poseen un sistema inmunológico completo para la defensa contra las infecciones y enfermedades que se desarrollan permitiendo al organismo ser saludable. Al igual que los mamíferos, se compone de una primera línea de defensa, la respuesta innata o inmediata conocida como no específica (Hitzfeld, 2005). Ésta se encuentra presente para detectar, combatir y eliminar patógenos (hongos, virus, bacterias y protoctistas) que logran pasar, infectar o tener contacto con el organismo. La segunda, respuesta adaptativa o específica, ocurre una vez que ya existió una infección previa, y el organismo genera una memoria y responde de manera específica al antígeno. Ambas respuestas se pueden llevar a cabo tanto por factores humorales como celulares (Delves, 2000).

La diferencia principal entre el sistema inmune de los peces y mamíferos son los órganos presentes encargados de actuar como órganos linfoides primarios y secundarios. En el caso de los peces teleósteos, el riñón cefálico, análogo de la médula ósea y el timo son los órganos linfoides primarios más importantes, ya que son responsables de la hematopoyesis de las

células inmunitarias, mientras que el bazo y el tejido linfoide (mucosa), representan órganos secundarios en peces (Maguregui, 2020).

1.5.1 Plasma sanguíneo

La respuesta inmune innata se compone de la respuesta celular donde participan todas las células encargadas de defender al organismo y la humoral, es decir toda aquella molécula, factor soluble, barrera que no contenga material celular. Entre estos factores humorales solubles está la sangre, la cual es un buen indicador de la condición inmunológica en un ambiente específico. Es un tejido formado por glóbulos rojos, glóbulos blancos los cuales contienen todas las células inmunitarias, trombocitos o plaquetas y el plasma (IQWIG, 2019). En los peces la sangre se compone de un 20-40% de eritrocitos, 0.5-2.0% de glóbulos blancos (leucocitos) y la mayor parte de la composición de la sangre es el plasma con un 60-80% (Duque, 2017) . El plasma es la parte líquida no celular de la sangre, de color amarillo, que se compone de electrolitos, nutrientes, proteínas, hormonas y es un indicador del sistema inmune ya que contiene todas las moléculas que activan directa o indirectamente la respuesta inmunológica, entre las que se encuentran las citocinas (mensajeras), proteínas del complemento (cascada de proteínas y enzimas) y anticuerpos que trabajan en la respuesta adaptativa para evitar infecciones (Delves, 2000).

El plasma participa en la inmunidad humoral, y entre los factores solubles está el complemento. Este sistema tiene un mecanismo donde participan más de 30 proteínas y enzimas que trabajan de manera activa e inactiva, y están contenidas en el plasma asociadas al citoplasma o en la superficie de las células del organismo, y que presentan diferentes formas de activación que incluyen a las proteasas. En general las funciones principales del complemento consisten en dar respuesta inflamatoria, eliminar el patógeno u agente extraño, limpiar células disfuncionales, así como ser un puente entre el sistema inmune innato y el sistema adaptativo (Gularte, 2020; Maguregui, 2020).

1.5.2 Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima del grupo de las hidrolasas, que participa en procesos de fosforilación y desfosforilación, además de encargarse de metabolizar el fosfato inorgánico a partir del fosfato orgánico (Álvarez *et al.*, 2008). Su implicación fisiológica en los vertebrados está relacionada en el proceso de mineralización y estructura ósea (Harris, 1989). De las funciones principales de las fosfatasas en peces involucra procesos de crecimiento, diferenciación celular, procesos de permeabilidad, maduración gonadal, transporte de nutrientes, agua, iones, glucosa, proteína y lípidos (Fournier *et al.*, 1991). En el sistema inmune de los peces esta enzima se encuentra especialmente en el hígado y células óseas, sin embargo, una vez que el tejido se enferma éstas liberan las enzimas a la sangre y son utilizadas como indicadores para detectar daño renal, alteraciones en el epitelio intestinal, colestasis y problemas hepático (Herrera, 2004).

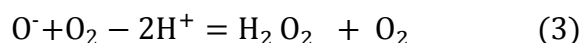
1.5.3 Proteasa y antiproteasa

En la sangre hay enzimas que participan en la inmunidad, las proteasas son proteínas tipo hidrolasas que se encargan de hidrolizar los enlaces amida de las unidades peptídicas específicas de los polipéptidos, sin embargo algunas llegan a ser enzimas inespecíficas perjudiciales para las proteínas involucradas en el sistema inmune (González *et al.*, 2018). Además de cumplir la hidrólisis de las proteínas, desempeñan funciones en los procesos digestivos, activación de prohormonas, proenzima y otras más (Stroud, 1974). Es importante mantener un equilibrio de las proteasas en el sistema inmune, y es donde participan las antiproteasas, enzimas que detienen la hidrólisis de las proteínas, inhibiendo a las proteasas ya sea anclándose a éstas o bien atrapándolas para evitar la hidrólisis peptídica. Al neutralizar a las proteasas, se mantiene la estabilidad del pez evitando el crecimiento de patógenos que provoquen enfermedades (BHOOLA, 1969; Álvarez *et al.*, 2008; Agbowuro *et al.*, 2018; González *et al.*, 2018).

1.5.4 Enzimas antioxidantes

1.5.4.1 Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) es una de las principales enzimas antioxidantes descubierta en 1968 (Mc Cord y Fridovich, 1969), y se encuentra presente en todos los organismos vivos. Su función, al igual que todas las moléculas antioxidantes es mantener en equilibrio a todas las especies reactivas de oxígeno reactivas y evitar el daño oxidativo de las células. La SOD, es una metaloenzima que utiliza un metal como cofactor, comúnmente Cobre, Zinc, Manganeso o Hierro (García, *et al.*, 1995). El papel de la enzima dentro del sistema inmune es actuar como la primera línea de defensa innata a las especies reactivas del oxígeno catalizando la dismutación del anión superóxido ($O^{\cdot -}$) a oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno, evitando la formación de peroxinitrito que es altamente tóxico al organismo y puede provocar daños a los tejidos, además de eliminar los radicales libres de las células (Ríos *et al.*, 2013; Wang y Zhang, 2015; Gularte, 2020). La siguiente ecuación nos muestra como sucede esta conversión (Mc Cord y Fridovich, 1969):



1.5.4.2 Peroxidasa

Entre las peroxidasas encontramos a la mieloperoxidasa (POX), que es una enzima antioxidante que responde a las especies oxígeno reactivas en conjunto con la SOD y la catalasa. Está en conjunto de un grupo prostético hem unido a proteínas, debido a esto son capaces de oxidar otros sustratos, no solo el H_2O_2 (Díaz, 2003; De Albuquerque *et al.*, 2019). La POX es secretada por las células inmunitarias, específicamente los neutrófilos, donde cataliza los aniones de superóxido para producir ácido hipocloroso (HOCL), a partir de la degradación del peróxido de hidrógeno proveniente de la dismutación de los radicales libres del superóxido (González *et al.*, 2018; Gularte, 2020). Se considera una indicadora del sistema inmune ya que al producir HOCL, aumenta la respuesta debido al efecto bactericida ya que es altamente tóxico cuando se entrelaza con la pared celular de los microorganismos (Reyes *et al.*, 2017).

En el presente trabajo se evaluó la respuesta humoral por medio de actividad enzimática y estatus antioxidante involucrado en el sistema inmunológico con fines de conocer la respuesta inmune de Tilapia cultivada en sistemas de biofloc heterotrófico, quimitrófico y suministrado con microalgas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de *Oreochromis niloticus* con tecnología biofloc

Existe un efecto positivo en el desempeño productivo de las tilapia dentro de los sistemas TBF, tal es el caso del estudio realizado en Indonesia, donde se cultivó la tilapia en diferentes densidades y con una relación de C:N de 15:1. Los resultados denotaron que los tratamientos con biofloc en densidades de 25 org/m³ el porcentaje de supervivencia aumentó y que además en las densidades de 50 org/m³ se suministró menor cantidad de alimento a comparación de los controles (Ekasari y Maryam, 2012). Diversas investigaciones han reportado que al utilizar los sistemas de biofloc desarrollan la estabilidad del cultivo reduciendo la presencia de patógenos, permitiendo tener un mayor crecimiento de los peces y reduciendo a su vez el costo de producción por disminuir el suministro de alimento balanceado (Monroy *et al.*, 2013).

Recientemente se analizó el crecimiento de la larva de *O. niloticus* en sistemas con TBF con un control manteniendo el radio de C: N en 10:1. Se destacó que, dentro de la uniformidad de las larvas, en sistemas TBF tuvieron mejor aspecto, además la supervivencia fue de un rango del 90% a comparación del sistema control que obtuvo 75%. A su vez se realizaron pruebas de inhibición del crecimiento bacteriano y tolerancia de salinidad, en todas las larvas cultivadas en biofloc se obtuvo una supervivencia arriba del 50% a comparación del sistema control (Ekasari *et al.*, 2015).

Lima *et al.*, (2015) cultivaron en TBF *O. niloticus* a tres diferentes densidades de siembra (D15, D30, D45 org/unidad de siembra), donde se observó que los tratamientos tuvieron diferencias significativas en el crecimiento, siendo la D45 la más efectiva y aunado a esto se observó >90% de supervivencia en los tres tratamientos con inclusión del biofloc. Long *et al.*, (2015) establecieron un cultivo de tilapia en TBF y al finalizar las 8 semanas del experimento evaluaron la calidad de agua, el crecimiento y los parámetros zootécnicos de los peces dando como resultado un incremento en los porcentajes de calidad de agua, crecimiento y una supervivencia del 100 % a comparación de los peces cultivados en sistemas con intercambio de agua.

Algo importante a destacar es la presencia de flóculos ricos en microorganismos que al estar presentes en el sistema benefician el cultivo, no solo como alimento como ya se ha mencionado sino como herramientas vivas para desplazar a los microorganismos oportunistas causantes de infecciones y enfermedades por bacterias en equilibrio que benefician a los organismos (Gutiérrez *et al.*, 2016).

En el estudio realizado por (Zapata *et al.*, 2017) se evaluó el cultivo de alevines de *O. niloticus* sometidos a tres diferentes tratamientos de biofloc con relación al C:N. El tratamiento establecido en un ratio de C:N de 10 con 30 org/m³, se observó una mejoría en la calidad de agua con respecto a los parámetros fisicoquímicos (Nitrógeno y Fósforo), dando como consecuencia un incremento en el desempeño productivo con base a el crecimiento del pez y a la supervivencia del cultivo.

Fimbres *et al.*, (2020) llevó a cabo experimentos incluyendo diferentes niveles tróficos de biofloc en el cual está basada la presente tesis. Se trabajó con cinco tratamientos de biofloc; T1: heterotrófico, T2: quimiotrófico (tratamiento control) y tres tratamientos con biofloc fotoautotrófico (suministrado diferentes especies de *Chlorella*). Los resultados mostraron que en las primeras semanas los tratamientos con microalga resultaron tener mayor porcentaje de productividad y supervivencia a comparación de los tratamientos control; sin embargo, al final del experimento los tratamientos control tuvieron mayor porcentaje de supervivencia y productividad, no obstante, estadísticamente no fueron significativos, por lo que se concluyó que los cinco tratamientos terminaron con el mismo desempeño productivo.

Por último en los cultivos quimiotróficos se ha observado que son capaces de realizarse en sistemas hiperintensivos, tal es el caso de la tilapia cultivada en diferentes densidades de siembra con este sistema llegando a los 800 org/m³ dando como resultado una relación positiva en la calidad de agua, desempeño en crecimiento, supervivencia, sin embargo, el mejor desempeño productivo se obtuvo en densidades de 406 org/m³ (Corrêa da Silva *et al.*, 2022).

2.2 Sistemas integrados de TBF con implementación de microalgas

Debido al potencial de las microalgas dentro de los ecosistemas acuáticos, se ha decidido estudiar distintos cultivos con inoculación de especies de microalgas, entre las más utilizadas están las del género *Chlorella*. En Corea, donde se realizó una investigación evaluando los efectos positivos sobre un cultivo de *O. niloticus* en biofloc suministrado con dos distintas especies de microalgas, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* donde se pudo demostrar una mejoría en la calidad de agua reduciendo el recambio de agua a un 82%, en consecuencia, aumentando el porcentaje de supervivencia a un 76% después de 12 días, al contrario del grupo control. Siendo efectivo esta inclusión debido a la riqueza de aminoácidos presentes que funcionan como proteína (Jung *et al.*, 2017). Las investigaciones sobre los efectos de sistemas de inclusión de microalgas han demostrado la capacidad de tratar el agua. En un estudio de cultivo de tilapia con ambas tecnologías de TBF Y ABFT, se observó que a diferencia de los sistemas sin biofloc, el agua se purificó en un 82% a comparación de los sistemas control, al igual que el desempeño productivo (Kim *et al.*, 2020). Por otro lado Fernandes (2020) realizó un cultivo de biofloc con *O. niloticus* suministrado con *Scenedesmus obliquus*, y obtuvieron como resultado a una concentración de 5 mg/l un aumento del 14% en supervivencia del cultivo a comparación de los grupos sin inclusión de microalgas y a diferentes concentraciones, así como un incremento del desempeño productivo reflejado en la biomas de los peces (Silva *et al.*, 2022).

2.3 Respuesta inmune en *Oreochromis niloticus* cultivada en TBF

Las investigaciones sobre la respuesta inmune en tilapia han aumentado en los últimos años, puesto que es uno de los procesos más importantes para tener un cultivo sano y mejorar a la supervivencia de los peces. En el estudio de Mansour y Esteban (2017) evaluaron el cultivo intensivo de Tilapia con respecto a la respuesta inmune humoral. Observaron un incremento significativo a comparación de los tratamientos control en el perfil hematocrito, en enzimas antioxidantes como la SOD, la CAT y mieloperoxidasa, entre otros parámetros inmune celulares. El efecto de la TBF ha impulsado el incrementó del desempeño productivo de peces, tal es el

caso de la investigación realizada en Chennai, donde el tratamiento con biofloc presentó diferencias significativas en parámetros inmunológicos, la actividad de las enzimas antioxidantes como lo son la superóxido dismutasa, la catalasa y la mieloperoxidasa tuvieron mayor actividad a comparación al grupo control el cual no tenía un sistema integrado con biofloc (Menaga *et al.*, 2019).

A su vez también evaluando el perfil hematocrito como en el caso de la investigación realizada en Brasil por Araújo (2018) donde el perfil hematocrito de la tilapia de Nilo cultivada en floc verde tuvo diferencias significativas a comparación de los otros tratamientos involucrados en la investigación. Evaluando los efectos positivos sobre un cultivo de *O. niloticus* en biofloc suministrado con distintas especies de microalgas, *C. vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, se observó una respuesta inmune superior a comparación del sistema control, donde la actividad lisozima tuvo mayor actividad (Jung *et al.*, 2017). Dado los resultados anteriormente observados, se recomienda incluir nuevas tecnologías que ayuden a promover e incrementar una mejora en el sistema inmune y así poder evitar infecciones en los cultivos y aumentar la supervivencia del cultivo.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el cultivo de Tilapia del Nilo representa una actividad de alto valor social y económico, y ha sido catalogada como una de las especies dulceacuícolas que pueden responder a las demandas de proteína ante una población creciente. No obstante, los cultivos comprometen la calidad del recurso de agua por el incremento de la liberación de efluentes enriquecidos con materia orgánica a los ecosistemas acuáticos, entre otros efectos adversos. En este sentido, es necesaria la inclusión de tecnologías innovadoras que favorezcan el desarrollo sustentable de los sistemas acuícolas con la tecnología biofloc. La incorporación de estos sistemas permitirá adecuar la calidad de agua, optimizar el rendimiento productivo y mejorar su respuesta inmune, con el fin de aumentar los índices de supervivencia y crecimiento del cultivo siendo ésta una opción biosegura y sustentable.

4. HIPÓTESIS

Si el sistema hiperintensivo de biofloc suministrado con microalgas confiere una mejoría en el rendimiento productivo del cultivo de tilapia *O. niloticus* entonces este mismo estimulará la capacidad inmunológica del organismo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar la capacidad inmunológica de la tilapia *O. niloticus* en sistemas hiperintensivos de biofloc heterotrófico, quimiotrófico y suministrado con microalgas.

5.2 Objetivos específicos

- Analizar enzimas antioxidantes e hidrolíticas en el plasma de *O. niloticus*
- Evaluar la actividad bactericida del plasma de *O. niloticus*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Las tilapias de la especie *Oreochromis niloticus* fueron adquiridas en la Unidad Nayarit del Centro de investigaciones Biológicas (UNCIBNOR+) ubicada en Tepic, Nayarit, México. Se trasladaron organismos masculinizados con tallas de 0.33 ± 0.14 g al CIBNOR unidad La Paz, BCS. Una vez que arribaron los peces se integraron directamente en los sistemas de biofloc experimentales. El experimento se realizó durante cuarenta semanas, el cual consistió en montar 15 estanques de 1m^3 , en donde los organismos se trataron en dos etapas diferentes: en la primera etapa (semana 1-20) se sembraron $180 \text{ org}/\text{m}^3$ de 14-60 g. La segunda etapa de engorda (semana 21-40), la cual consistió en una siembra denominada de baja densidad ($55 \text{ org}/\text{m}^3$) donde alcanzaron los 60-500 g. Se alimentaron cinco veces al día, cada tres horas de 8 am- 8 pm con alimento marca Purina-Cargil® con 44% de proteína (Fimbres-Acedo, 2019).

Se realizaron los siguientes cinco tratamientos con tres replicas cada uno (Fig. 3): 1) biofloc heterotrófico; 2) biofloc quimiotrófico; 3) biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: *C. sorokiniana-2714*, *C. sorokiniana-2805* y *Chlorella spp.* Los tanques contaron con un sistema de aireación por un blower de 1 Hp. Cada base del tanque estaba conformado por un anillo de tipo manguera multiporo con un diámetro de 1 pulgada, con microburbuja que generó una cortina de aire de forma cilíndrica y uniforme, administrada al centro, promoviendo las partículas suspendidas para la producción asertiva de biofloc en los tanques, generando suficiente aireación en el sistema ($> 6 \text{ mg}/\text{l}$, O_2) (Fimbres-Acedo, 2019).

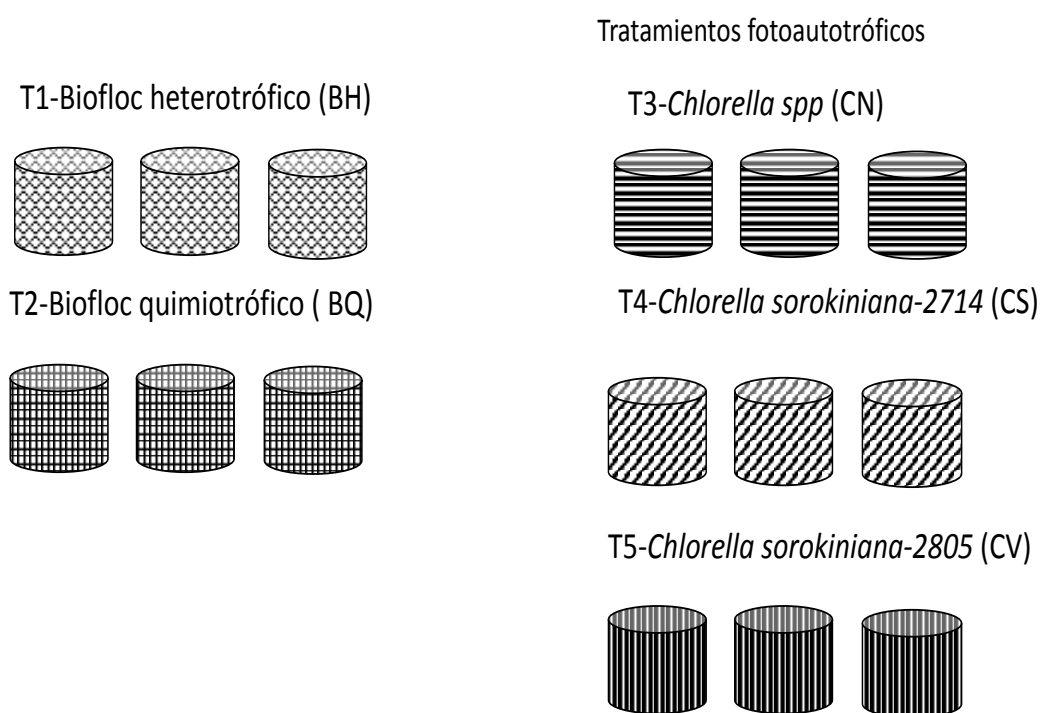


Figura 3. Diseño experimental T1) biofloc heterotrófico; T2) biofloc quimiotrófico; biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: T3) *Chlorella spp*, T4) *Chlorella sorokiniana*-2714 y T5) *Chlorella sorokiniana*-2805.

6.2 Tratamientos con Biofloc

6.2.1 Tratamiento heterotrófico (T1)

En el tratamiento de biofloc heterotrófico (BH) los tanques se cubrieron con malla sombra verde con 90% de retención de luz. Este tratamiento se utilizó como control para comparar con los demás tratamientos. Cada tanque se inoculó con 100 ml de agua de los bionitrificadores de un experimento realizado en un sistema acuícola de recirculación (SAR) llevado a cabo en las mismas instalaciones (Fimbres-Acedo, 2019). La relación de C:N en el tratamiento control fue de 13:1 por lo que se monitoreó agregando azúcar blanca como fuente de carbono diariamente junto con su primera ración de alimento (Avnimelech, 1999; Fimbres-Acedo, 2019). La medición del biofloc se llevó a cabo con muestras tomadas en conos Imhoff de 1 l para medir los sólidos suspendidos por triplicado en cada tanque, para cuantificar la producción de biofloc cada 30 minutos, 1 y 2 h.

6.2.2 Tratamiento quimiotrófico (T2)

El tratamiento quimiotrófico (BQ) los tanques se cubrieron con malla sombra verde con 90% de retención de luz. Se adquirieron 3 kg de biomedio de cada uno de los bionitrificadores (12 con 339 l / 0.1 m³ de biomedio) del experimento del cultivo de SAR, los cuales se mezclaron en dos tanques de 1 m³, se mantuvieron en oscuridad y fueron inoculados cada tercer día con una solución con urea y fósforo (Ebeling *et al.*, 2006; Fimbres-Acedo, 2019).

6.2.3 Tratamientos fotoautotróficos (T3-T5)

Se utilizaron tres especies de microalgas, *Chlorella sorokiniana*-2714 (CS), *C. sorokiniana*-2805 (CV) y *Chlorella spp* (CN) las cuales fueron adquiridas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR situado en La Paz, Baja California Sur, México (Fimbres-Acedo, 2019). Se inició un proceso de escalamiento de las microalgas donde anticipadamente se mantuvieron en una solución mineral sintética y bajo condiciones de iluminación en matraces Erlenmeyer por 15 días. Posteriormente se colocaron en cilindros de 20 l por los mismos días a temperatura ambiente (23±1 °C), bajo condiciones de iluminación fluorescente (60 µmol/s/m²) con aireación constante 12 V-3.20 LPM (AQUA 12W, EVANS®, Jalisco, México). Transcurrido el tiempo, se escalaron en seis tanques de 1m³ (nivel del cultivo fue de 200 l) por semana con cosechas alternadas y se alimentaron con alimento comercial Fertiplus®. Se inoculo a cada tanque semanal a una concentración de 10⁷ células/l por tratamiento.

6.3 Actividad enzimática. Respuesta inmune humoral

Una vez finalizado el experimento, en la semana 40 se tomaron muestras de sangre para obtener el plasma y llevar a cabo diversos ensayos. La sangre se extrajo de la vena caudal del pez con una jeringa tipo insulina la cual contenía heparina para evitar la coagulación. Se obtuvieron en total aproximadamente 2 ml de sangre por cada pez, en cada tratamiento por sextuplicado. Una vez recolectada la sangre, esta se centrifugó a 3200 × g por 12 min a 25 °C, para la obtención del plasma sanguíneo. Una vez obtenida la muestra se conservó a -80 °C hasta

su procesamiento. Para las pruebas inmune humorales y antioxidantes correspondientes, se hizo una dilución con agua destilada del plasma a 1:5.

6.3.1 Cuantificación de proteínas (Bradford, 1976)

Para determinar las proteínas solubles totales se cuantificaron por el método Bradford (1976), el cual se basa en el cambio de color del colorante azul de Coomassie en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. Esto debido a que el colorante se enlaza inicialmente con residuos de aminoácidos como la arginina. La determinación de la coloración del pigmento se realizó por espectrofotometría a 595 nm en un lector de microplaca (Thermo Scientific Varioskan® Flash), con previa calibración de la curva estándar de albumina sérica bovina (1 mg/ml). En cada pocillo se colocaron 10 µl de plasma (1:5) y 200 µl de solución Bradford (1:5), este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra. La determinación de la coloración del pigmento se recreó por espectrofotometría en lector de microplaca. Con la curva de calibración de albumina se interpoló la concentración de proteínas de cada muestra, y la concentración total de proteína se expresó en mg proteína/ml de muestra (Thermo Scientific Varioskan® Flash).

6.3.2 Actividad antiproteasa

Para el ensayo se utilizaron microtubos de PCR 0.2 ml (Sigma-Aldrich). A cada uno se le añadieron 10 µl de suero, 30 µl de tripsina (1 mg/ml) y 250 µl de azocaseína al (1.6 mg/ml) dando un total de 290 µl para cada tratamiento por triplicado. A su vez se utilizaron dos controles, uno positivo y uno negativo, donde el positivo se preparó con 40 µl de tripsina y 250 µl de azocaseína. El control negativo 40 µl de amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 7) y 250 µl de azocaseína. Las muestras se incubaron durante una hora tapadas con aluminio en constante agitación a 37 °C. Al terminar el tiempo de incubación cada muestra se centrifugó a 6000 × *g* por 5 minutos (Eppendorf-Centrifuge 5430R). De cada microtubo se tomaron 100 µl del sobrenadante y se colocaron en pozos de microplaca (96 Wells microplate Greiner Bio-one). Las muestras se cuantificaron en el lector de microplaca (Thermo Scientific Varioskan® Flash) a una longitud de onda de 490 nm. La actividad antiproteasa se cuantificó en % de inhibición de la tripsina aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de tripsina} = \frac{\text{Abs control positivo} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control positivo}} \times 100 \quad (4)$$

6.3.3 Actividad proteasa

Para cuantificar la actividad proteasa del plasma, se realizó el ensayo que involucra la hidrólisis de la azocaseína descrito por Charney and Tomarelli (1947). Se utilizaron microtubos de 0.2 ml (Sigma- Aldrich), a cada uno se le añadieron 10 μ l de suero y 10 μ l de amortiguador de fosfatos con azocaseína al 0.7 % (100 mM, pH 7). A su vez se utilizaron dos controles, uno positivo (100% actividad) y uno negativo (0% actividad). El control positivo se preparó con 20 μ l tripsina y el control negativo consistió en 20 μ l de amortiguador de fosfatos con azocaseína al 0.7% (100 mM, 7 pH). Todas las muestras se realizaron por triplicado. Posteriormente las muestras se incubaron durante 24 h tapadas con aluminio a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo de incubación la reacción se detuvo añadiendo 50 μ l de ácido tricloroacético (TCA). A continuación, se centrifugó a 10,000 x *g* por 10 min (Eppendorf-Centrifuge 5430R). En una microplaca de 96 pozos, se colocó en cada pocillo todo el sobrenadante recuperado de cada muestra y se añadió 100 μ l de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.5 N. Para finalizar se cuantificaron en un lector de microplaca (Thermo Scientific Varioskan® Flash) a una longitud de onda de 450 nm. La actividad proteasa se expresó en u/mg proteína.

6.3.4 Determinación de la fosfatasa alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina se evaluó por el método fluorométrico (Toledo *et al.*, 2011). En cada pocillo de una microplaca de 96 pozos (Fluoroluminic plate), se agregaron 140 μ l de buffer (Glicina 100 mM, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM, pH 10.4), 10 μ l del plasma y 50 μ l del sustrato 10 mM (DiFMUP- Difluoro-4methyllumbelliferil fosfato + Buffer de fosfatasa) diluido en DMSO. Este procedimiento se repitió para cada muestra por triplicado. Se realizó una cinética enzimática a 37 °C en un espectrofotómetro durante 24 h (Thermo Scientific Varioskan® Flash) a una emisión de 460 nm y excitación a 355 nm. La determinación de fosfatasa alcalina se expresó en unidades por mg de proteína (U/mg proteína).

6.3.5 Superóxido dismutasa

La actividad antioxidante del superóxido dismutasa (SOD) se basa en el ensayo donde la reacción xantina/xantina oxidasa es la generadora de un radical libre y el citocromo C es el detector de éste al reducirse. Por lo tanto, este ensayo se basa en la inhibición de la reducción del citocromo C por la SOD. Para comenzar el ensayo se realizó un cóctel con los siguientes reactivos: 25 ml del reactivo A (Buffer de fosfato al 0.216 M, pH 7.8 a 25 °C), 1 ml del B (Ácido etilendiaminotetraacético- EDTA 10.7 mM, Na₂), 1 ml del C (Citocromo C al 1.1 mM) y 50 ml del D (Xantina 0.108 mM), al finalizar se aforó a 100 ml con H₂O desionizada, se ajustó el pH a 7.8 a temperatura ambiente. En una celda de fibra de vidrio (1 cm) se colocaron 1.980 µl de cóctel + 20 µl de xantina oxidasa (diluída 1:600) y se leyó de manera cinética por dos minutos una longitud de onda de 550nm para obtener la pendiente del control (0.0159). Una vez finalizado el control, se colocaron 1.970 µl de cóctel + 10 µl del plasma + 10 µl de xantina oxidasa (diluída 1:600) y se leyó de manera cinética por dos minutos a una longitud de onda de 550nm en el espectrofotómetro (DU^R 800 -BECKMAN COULTER) para obtener la pendiente de cada muestra, este proceso se repitió por duplicado.

Se calculo el % de inhibición con la siguiente formula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (5)$$

Donde A = ΔA_{550nm} /min de cubeta A

Donde B = ΔB_{550nm} /min de cubeta B

$$U/ml = \frac{\% \text{ de inhibición}}{(50\%)(ml \text{ de la muestra})} \quad (6)$$

$$U/mg = \frac{U/ml}{mg/ml \text{ de proteína de la muestra}} \quad (7)$$

Una unidad (U) se define como la cantidad necesaria de muestra para inhibir en un 50% la reducción del citocromo c.

6.3.6 Peroxidasa (TMB)

Para el ensayo de cuantificación de la actividad mieloperoxidasa, en cada pozo de una placa de 96 pozos, se añadieron 20 μ l de plasma por cada muestra por triplicado. En una probeta de 100 ml cubierta con aluminio se agregaron 40 ml de buffer citrato-fosfato pH 5 (0.2 M fosfato dibásico + 0.1 M ácido cítrico + H₂O desionizada), 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30% y una pastilla de sustrato TMB (tetrametilbencidina) (Sigma Núm. Catálogo #S5814), se agitó en oscuridad hasta desvanecer por completo la pastilla TMB. Una vez homogenizada la mezcla se agregaron 100 μ l en cada pocillo. Una vez que comenzó la reacción inmediata, se detuvo con ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 40 mM, agregando 50 μ l por pozo. Posteriormente se leyó en el lector de microplaca (Thermo Scientific Varioskan®Flash) a 450 nm en espectrofotometría de punto final.

Para calcular las unidades por mg de proteína (U/mg proteína) de la actividad antioxidante con las absorbancias se aplicó la siguiente formula:

$$U/ml = Abs \times ml \text{ de mezcla de la reacción} \quad (8)$$

$$U/mg = \frac{U/ml}{mg/ml \text{ proteína}} \quad (9)$$

6.4 Inhibición del crecimiento bacteriano

La actividad bactericida del plasma fue determinada con *Exiguobacterium sp.* En un tubo eppendorf de 2 ml se diluyeron en medio de cultivo colonias frescas de *Exiguobacterium sp* a una concentración de 1×10^3 células/ml en una absorbancia de 0.5. En seguida, en cada pocillo de una microplaca de 96 pozos (96 Wells microplate Greiner Bio-one), se adicionaron 10 μ l de plasma, 10 μ l de la dilución bacteriana y 180 μ l de medio de cultivo. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra, además se emplearon dos blancos, el primero se identificó como positivo y consistió en agregar 20 μ l de dilución bacteriana y 180 μ l de medio de cultivo, mientras que el control negativo era únicamente 20 μ l de plasma más 180 μ l de medio

de cultivo. Una vez montada la placa, se incubaron a 37 °C por 24 h, mientras se realizaba una espectrofotometría cinética (Thermo Scientific Varioskan®Flash) de 12 h a 600 nm para determinar la actividad bactericida del plasma.

Los datos de absorbancia obtenidos en la cinética se procesaron de la siguiente manera:

$$DB_{\text{Solución: muestra}} \quad DB_{\text{Referencia: control}}$$

$$DB = (\text{Absorbancia}_t - \text{Absorbancia}_0) \quad (10)$$

$$\text{Inhibición de Crecimiento bacteriano (ICB)} = \left(1 - \frac{DB_{\text{Solución}}}{DB_{\text{Referencia}}} \right) \times 100. \quad (11)$$

6.5 Análisis estadísticos

Para determinar si existían diferencias significativas entre los cinco tratamientos de biofloc se revisaron los supuestos estadísticos tomando en cuenta la prueba de Distribución Normal con Shapiro-Wilk, siendo esta una prueba paramétrica y el supuesto de homocedasticidad o bien homogeneidad de varianzas con Bartlett test. Una vez que los supuestos se cumplieran se realizó el análisis de Varianzas (ANOVA) de una vía con 95% de confianza y un valor de $p= 0.05$, al terminar si se encontraban diferencias significativas, se llevó a cabo la prueba de Tukey para identificar cuál de los tratamientos era significativo. Todos los análisis, gráficas y figuras se realizaron en el paquete estadístico Rstudio.

7. RESULTADOS

7.1 Actividad antiproteasa y proteasa

La Fig. 4 muestra la actividad antiproteasa del plasma extraído de *O. niloticus*, cultivada en cinco tratamientos diferentes de biofloc, la cual presenta una mayor capacidad inhibitoria (>40%) en el tratamiento de biofloc quimiotrófico (BQ; ANOVA, $F_{4,25} = 4.831$, $P < 0.05$), a comparación de la muestra control (BH) y los tres tratamientos fotoautotróficos (CN, CS y CV).

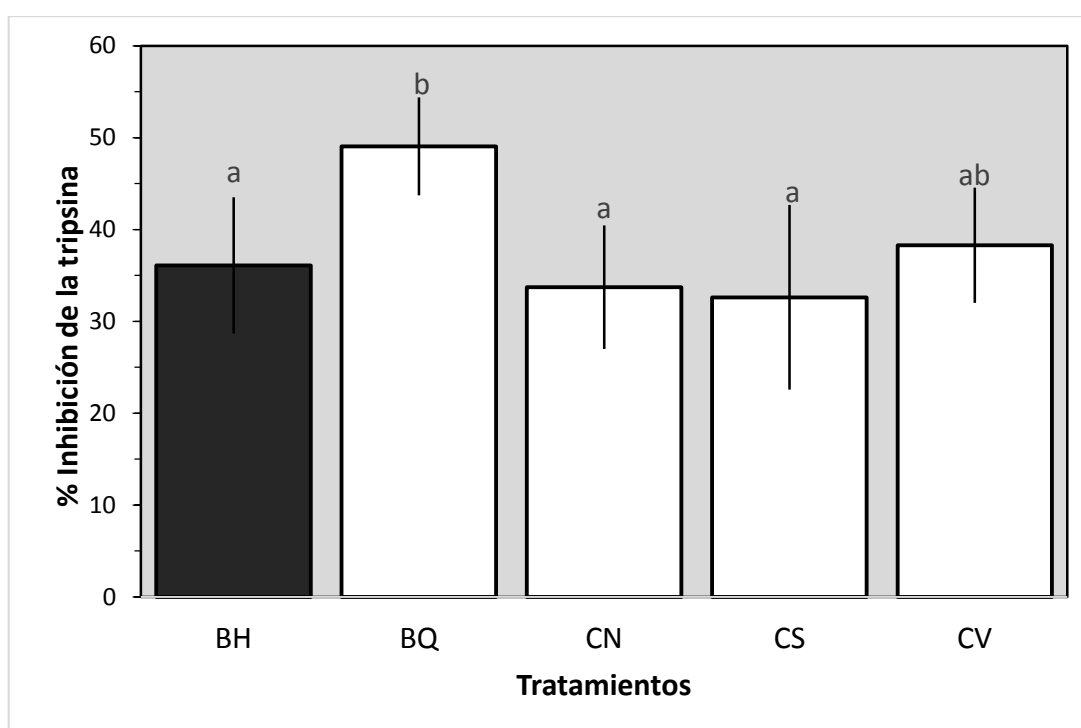


Figura 4. Actividad antiproteasa (% de la capacidad inhibitoria de la tripsina) del plasma de *O. niloticus* cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: *Chlorella sorokiniana*-2805 (CN), *Chlorella sorokiniana*-2714 (CS) y *Chlorella spp* (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los tratamientos ($P < 0.05$).

Asimismo, la actividad proteasa se determinó por medio de espectrofotometría y se expresó en unidades/miligramo de proteína. La actividad proteasa del plasma de *O. niloticus* (Fig. 5), fue mayor en el tratamiento fotoautotrófico con *C. sorokiniana*-2805 (CN) comparado con el control

y los otros tratamientos, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos (ANOVA, $F_{4,25} = 1.917$, $P > 0.05$).

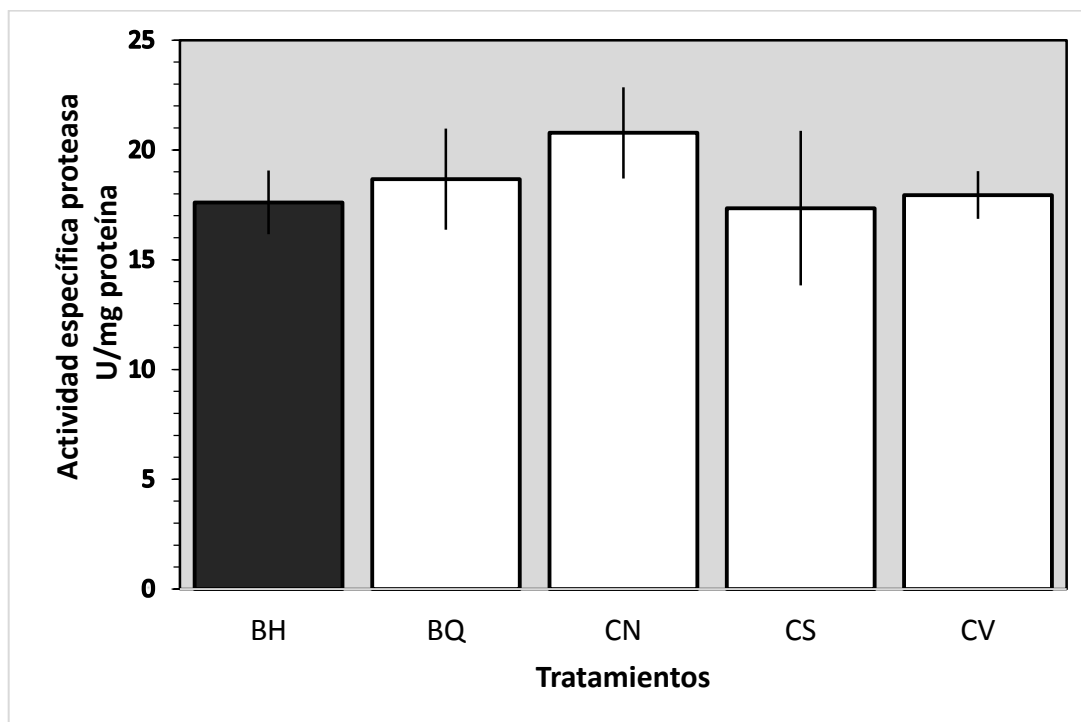


Figura 5. Actividad proteasa (U/mg de proteína) del plasma de *O. niloticus* cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: *Chlorella sorokiniana*-2805 (CN), *Chlorella sorokiniana*-2714 (CS) y *Chlorella spp* (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los distintos tratamientos.

7.2 Determinación de la fosfatasa alcalina

La determinación de la fosfatasa alcalina del plasma extraído de *O. niloticus* cultivada en cinco tratamientos diferentes de biofloc, se evaluó mediante espectrofotometría cinética. En la Fig. 6, se observa una disminución de la actividad en el control (BH) comparado con los demás tratamientos, sin embargo, no se presentan diferencias estadísticas significativas (ANOVA, $F_{4,25} = 0.292$, $P > 0.05$).

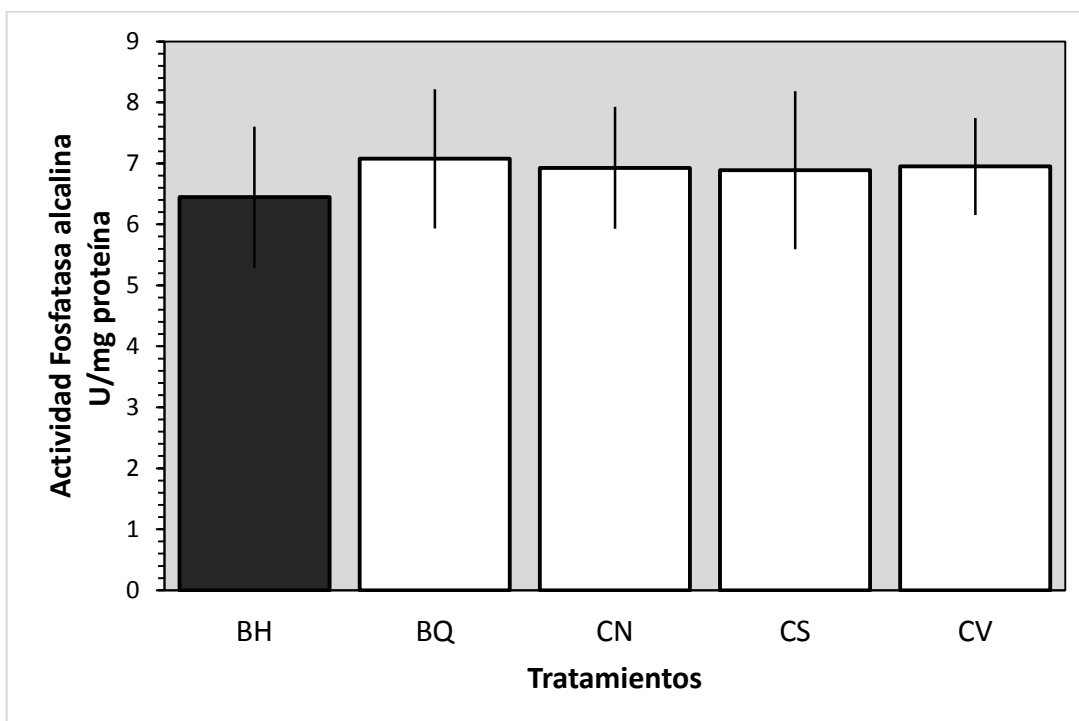


Figura 6. Actividad fosfatasa alcalina (U/mg de proteína) del plasma de *O. niloticus* cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: *Chlorella sorokiniana*-2805 (CN), *Chlorella sorokiniana*-2714 (CS) y *Chlorella spp* (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los distintos tratamientos.

7.3 Enzimas antioxidantes

La actividad específica del superóxido dismutasa (SOD) se evaluó mediante espectrofotometría cinética. De acuerdo con la Fig. 7, en el tratamiento con *C. sorokiniana*-2805 (CN) se observa un aumento en la actividad SOD que es estadísticamente significativa (ANOVA, $F_{4,25} = 4.39$, $p < 0.05$) en comparación con el control (BH) y los otros tratamientos (BQ, CS, y CV).

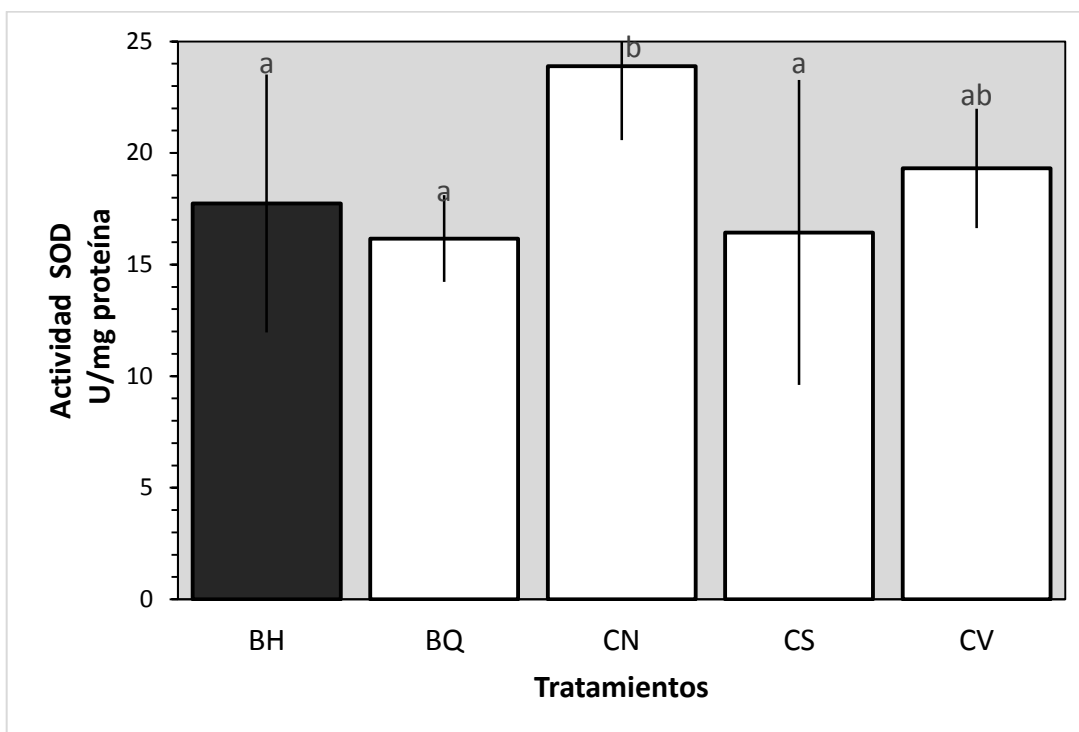


Figura 7. Actividad superóxido dismutasa (SOD; U/mg de proteína) del plasma de *O. niloticus* cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: *Chlorella sorokiniana*-2805 (CN), *Chlorella sorokiniana*-2714 (CS) y *Chlorella spp* (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los tratamientos ($P < 0.05$).

Dentro de los tratamientos en los cuales se observa una mayor diferencia en cuanto a la actividad SOD, representativa y estadísticamente es el biofloc con inclusión *C. sorokiniana*-2805 (CN), el cual presenta diferencias con ambos tratamientos sin inclusión de microalgas. Para la cuantificación de la actividad peroxidasa se realizó espectrofotometría puntual (Fig. 8), y se puede observar que entre los tratamientos existe una diferencia de ≤ 2 U/mg-proteína, alcanzando la mayor actividad el tratamiento de *C. sorokiniana*-2714 (CS) con >11 U/mg-proteína, sin embargo, estadísticamente no existen diferencias significativas de acuerdo con la actividad de la mieloperoxidasa (ANOVA, $F_{4,25} = 2.187$, $p < 0.05$).

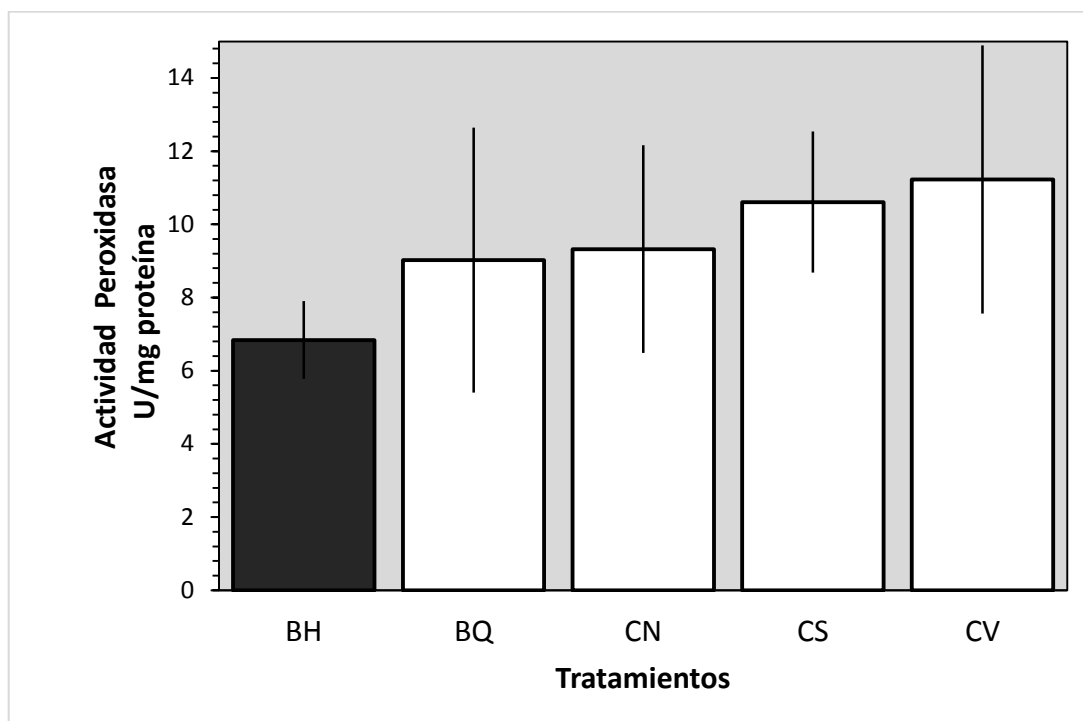


Figura 8. Actividad antioxidante peroxidasa (U/mg de proteína) del plasma de *O. niloticus* cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: *Chlorella sorokiniana*-2805 (CN), *Chlorella sorokiniana*-2714 (CS) y *Chlorella spp* (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los distintos tratamientos.

7.4 Inhibición de crecimiento bacteriano

La capacidad bactericida del plasma extraído de *O. niloticus* cultivada en cinco tratamientos diferentes de biofloc, se evaluó mediante la capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano por medio de espectrofotometría cinética. De acuerdo con la Fig. 9, se distingue una actividad inhibitoria del control (BH) $>15\%$, donde a comparación de los otros cuatro tratamientos su porcentaje es $\leq 13\%$. A pesar de obtener esta representación no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en función a la capacidad bactericida del plasma (ANOVA, $F_{4,25} = 0.146$, $p < 0.05$).

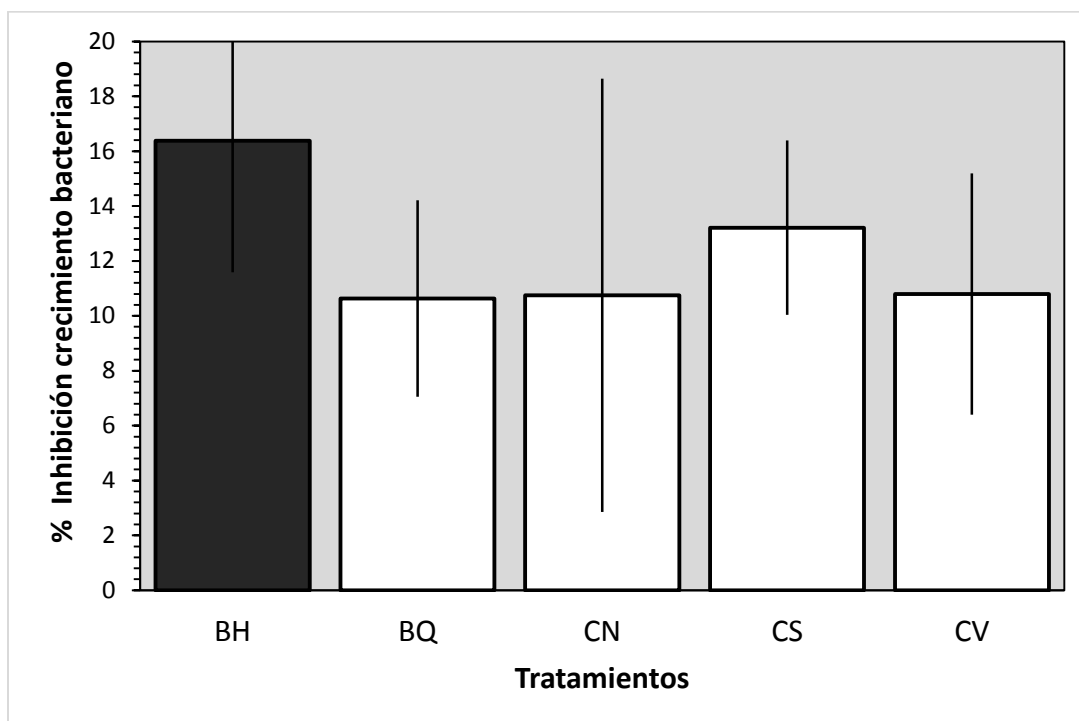


Figura 9. Efecto bactericida (% Inhibición del crecimiento bacteriano) del plasma de *O. niloticus* cultivadas en diferentes tratamientos de biofloc. Tratamientos: biofloc heterotrófico (BH); biofloc quimiotrófico (BQ); biofloc fotoautotrófico dividido en los siguientes: *Chlorella sorokiniana*-2805 (CN), *Chlorella sorokiniana*-2714 (CS) y *Chlorella spp* (CV). Los valores son la media \pm desviación estándar del plasma combinado de 6 organismos, por triplicado. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control (BH) y los distintos tratamientos.

8. DISCUSIÓN

8.1 Respuesta humoral no específica

La antiproteasa cuantificada por medio de la inhibición de la tripsina presentó diferencias significativas en el tratamiento quimiotrófico y con inclusión de *Chlorella spp.*, comparándolas con el control (biofloc heterotrófico, BH). Mientras que en la actividad proteasa del plasma extraído de *O. niloticus* no presentó diferencias entre el control y los tratamientos. Los resultados concuerdan con diversos estudios donde se han utilizado diferentes dietas, manejos de la relación C:N, e inclusión de microalgas o probióticos dentro de los sistemas biofloc (Hernández *et al.*, 2019). Tal es el caso de las observaciones de Elayaraja *et al.* (2020) donde dependiendo de la relación de C:N se diferenciaba el incremento en los niveles de actividad de antiproteasa y proteasa, esto puede explicar el comportamiento de la antiproteasa en los resultados de la presente investigación donde el control y el tratamiento quimiotrófico presentaron diferentes ratios de C:N. Las antiproteasas son esenciales para neutralizar a las proteasas, además de contribuir al sistema inmune no específico por las propiedades antiinflamatorias y bactericidas ante los patógenos anclándose a las proteasas de estos mismos y así evitando la entrada de los patógenos causante de enfermedades (Anusha *et al.*, 2020).

En la determinación de fosfatasa alcalina, no se encontraron diferencias entre los tratamientos, y la actividad se mantuvo constante. La fosfatasa alcalina en la sangre está ligada a la determinación de enfermedades hepáticas, renales e intestinales además de estar involucrada en el crecimiento del pez (Fournier *et al.*, 1991; Herrera, 2004). Los datos obtenidos en la presente tesis se obtuvieron a partir de un experimento realizado por Fimbres-Acedo (2019) quien a partir de los datos zootécnicos determinó que el peso ganado alcanzó los 500 g en todos los tratamientos, esto nos indica que los peces se encontraban en un buen estado de salud.

8.2 Enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes están relacionadas con la salud de los organismos, debido a que mantienen el equilibrio de las moléculas oxidantes, evitando el estrés oxidativo por la presencia

de especies reactivas de oxígeno (Carvajal, 2019). En el presente estudio se pudo observar un aumento en la actividad enzimática SOD del tratamiento con *Chlorella sorokiniana*-2805 a comparación del tratamiento control (BH) el cual contenía como fuente de carbón azúcar refinada a una proporción de C:N de 13:01. Estos resultados concuerdan con (Jung *et al.*, 2017) donde obtuvieron efectos positivos en la respuesta antioxidante SOD de *O. niloticus* cultivada con microalgas. En diversos estudios se ha encontrado que el uso de biofloc beneficia la actividad antioxidante. Menega *et al.*, (2019) determinaron la actividad de SOD y Mieloperoxidasa, ambas enzimas aumentaron a comparación de las enzimas evaluadas en peces no cultivados en biofloc. Elayaraja *et al.*, (2020) trabajaron con diferentes proporciones de C:N en donde el C12, similar al que se usó como nuestro control, tuvo diferencia significativa evaluando la SOD a comparación de los demás tratamientos de C:N. Por otro lado, al comparar la actividad peroxidasa del tratamiento control (BH) con los cuatro tratamientos presentaron una tendencia aumentando la actividad enzimática especialmente en los tratamientos con inclusión de *Chlorella*, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. En estudios anteriores la microalga *Chlorella* se ha utilizado como alimento en los cultivos intensivos de tilapia los cuales han demostrado el aumento de diferentes parámetros incluyendo la respuesta inmunológica que se ha evaluado con enzimas involucradas en el sistema inmune y enzimas antioxidantes como la peroxidasa (Peng *et al.*, 2020). Es importante mencionar que en estudios anteriores se ha observado el incremento de la respuesta antioxidante como la SOD y peroxidasa en peces cultivados en biofloc donde la fuente de carbono marcaba la diferencia a comparación de los sistemas RAS (Mansour y Esteban, 2017). El aumento antioxidante en las muestras de plasma provenientes de los peces cultivados en los tratamientos TBF, evidencia la salud y la probable disminución del estrés oxidativo de los peces (Parrilla *et al.*, 2012), los cuales concuerdan con los resultados zootécnicos del estudio previo realizado a la presente tesis (Fimbres *et al.*, 2019).

El desempeño productivo evidencia la salud de los organismos, una vez que el porcentaje de supervivencia aumenta estamos hablando de un desempeño productivo favorable en condiciones donde el biofloc heterotrófico junto con las microalgas estimulan la respuesta

inmunitaria y antioxidante además de mantener el cultivo en condiciones óptimas para el crecimiento (Kim *et al.*, 2019; Fernandes, 2020).

8.3 Inhibición del crecimiento bacteriano

La actividad bactericida del plasma extraído de *O. niloticus* cultivada en cinco tratamientos diferentes presentó un efecto bactericida moderado en el tratamiento control a pesar de no presentar diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados son similares a los de (Elayaraja *et al.*, 2020) ya que en todos sus tratamientos donde utilizaron azúcar de caña también observaron un efecto bactericida superior al control el cual se suministraba con un sistema RAS, por lo tanto no contenía una fuente de carbono. Como ya se mencionó anteriormente, la tecnología biofloc es un cultivo rico en microorganismos, incluyendo a las especies patógenas causantes de enfermedades, sin embargo, una de las principales características de este sistema es que al estar presente las bacterias benéficas en mayor porcentaje dentro del sistema, evitan en su mayoría que exista un brote infeccioso que perjudique la salud de los organismos (Silva *et al.*, 2022).

9. CONCLUSIONES

La tecnología biofloc se caracteriza por ser una estrategia eficiente en la producción acuícola especialmente para las especies que soportan altas densidades de siembra y sólidos suspendidos. Es por lo que, al cultivar la tilapia de Nilo, siendo esta una especie con alta demanda en el comercio es una opción biosegura y sustentable para el medio ambiente. La adición de carbón a los sistemas genera un gasto y efecto adversos al ambiente, por lo que se ha comenzado a incluir nuevas alternativas como la inclusión de microalgas a los sistemas biofloc que realicen la función de eliminar, consumir o tratar el amonio, nitritos y nitratos del agua mejorando así su rendimiento productivo y por subsecuente la salud de los organismos. De acuerdo con los resultados obtenidos dentro de esta investigación se observó que hubo un aumento en los niveles de Peroxidasa y SOD teniendo esta última diferencia significativas, en los tratamientos fotoautótrofos con inclusión de *Chlorella*. Además, que en la actividad antiproteasa el aumento ocurrió en el biofloc quimiotrófico y con inclusión de la microalga. Esto beneficia directamente al rendimiento productivo de los peces en el sistema, lo que nos indica que los microorganismos incluyendo a las microalgas en los sistemas de cultivo de biofloc son una fuente importante de compuestos bioactivos que estimulan el sistema inmune en *O. niloticus*. Por lo que indirectamente se acepta la hipótesis establecida que con base a los resultados obtenidos se pudo observar una mejoría en el sistema inmune mediante el análisis del plasma de *O. niloticus* por medio de las enzimas. Es importante resaltar que la mayoría de los estudios realizados analizando el sistema inmune de los organismos cultivados en biofloc realizaban sus comparaciones con un control en sistemas RAS, por lo que se recomienda continuar con las investigaciones incluyendo este sistema para contrastar las diferencias y tener mejor panorama para determinar el tratamiento más adecuado para la especie modelo utilizada en este trabajo.

10. LITERATURA CITADA

Agbowuro, A. A., Huston, W. M., Gamble, A. B. y Tyndall, J. D. A. (2018). Proteases and protease inhibitors in infectious diseases. *Medicinal Research Reviews*, 38(4): 1295–1331. doi: 10.1002/med.21475.

Álvarez-González, C. A., Márquez-Couturier, G., Arias-Rodríguez, L., Contreras-Sánchez, W. M., Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Moyano-López, F. J., Hernández-Jiménez, R., Civera-Cerecedo, R., Goytortua-Bores, E., Isidro-Olán, L., Almeida-Madrigal, J. A., Tovar-Ramírez, D., Gutiérrez-Ribera, J. N., Arévalo-Galán, L. M., Gisbert, E., Treviño, L. y Morales-Sánchez, B. (2008). Avances en la Fisiología Digestiva y Nutrición de la Mojarra Tenguayaca *Petenia splendida*. 135- 235 pp. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Juan Pablo Lazo y Ma. Teresa Viana. *Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. 24-27 de noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

Álvarez-Muñoz, D., Sáez, M., Blasco, J., Gómez-Parra, A., González-Mazo, E. (2006). Actividades enzimáticas de las fosfatasa ácida y alcalina y la catalasa en *Ruditapes philippinarum* como biomarcadores del estrés generado por tensioactivos aniónicos (C11-LAS) y no iónicos (NPEO2. 8). *Ciencias Marinas*, 32(2B): 447-455.

Anusha, S., Neeraja, T., Haribabu, P. y Akshaya, P. (2020). Effect of different biofloc based culture systems on the growth and immune response of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 8(6): 176-180.

Araújo, M. (2018). Cultivo intensivo da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* suplementado com microalga *Chlorella vulgaris* em sistema de bioflocos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil. 43 pp.

Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176(3-4): 227-235.

Avnimelech, Y. (2006). Bio-filters: The need for a new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering*, 34(3): 172–178. doi: 10.1016/j.aquaeng.2005.04.001.

Avnimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264(1–4): 140–147. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.11.025.

Avnimelech, Y. (2009). *Biofloc technology: a practical guidebook*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 181 pp.

Avnimelech, Y. (2011). Tilapia production using biofloc technology (BFT). 359-361 pp. Editores: L. Liping y K. Fitzsimmons. *Proceedings of the 9th International Symposium on Tilapia in*

Aquaculture. 22-24 April 2011. Shanghai, China. Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. y Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4): 173-186.

Bhoola, K. D. (1969). Protein Inhibitors. *Nature*, 223(5204): 426–426. doi: 10.1038/223426b0.

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.

Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1): 91–100.

Charney, J. y Tomarelli, R. M. (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*, 171(2): 501-505.

Collazos-Lasso, L. F. y Arias-Castellanos, J. A. (2015). Fundamentos de la tecnología biofloc (BFT). Una alternativa para la piscicultura en Colombia: una revisión. *Orinoquia*, 19(1): 77-86. doi: 10.22579/20112629.341

Corrêa da Silva, B., Massago, H., Alves de Andrade, J. I., de Leão Serafini, R. y Jatobá, A. (2022). Tilapia nursery stocking densities in a chemoautotrophic biofloc system. *Ciencia e Agrotecnologia*, 46. doi: 10.1590/1413-7054202246022321

Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P. y Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356: 351–356. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.04.046

Dauda, A. B. (2019). Biofloc technology: a review on the microbial interactions, operational parameters and implications to disease and health management of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 12(2): 1193–1210. doi: 10.1111/raq.12379

De Albuquerque, T. L., Silva, J de S., de Macedo, A. C., Gonçalves, L. R. B. y Rocha, M. V. P. (2019). Biotechnological strategies for the lignin-based biorefinery valorization. En: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, Amsterdam, pp.1-18. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.14570-6.

Delves, P. J. y Roitt, I. M. (2000). The Immune System. *New England Journal of Medicine*, 343(1): 37–49. doi:10.1056/nejm200007063430107

Díaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. *Revista de Educación Bioquímica*, 22(2): 76–84.

Ducrot, C., Bed'Hom, B., Béringue, V., Coulon, J. B., Fourichon, C., Guérin, J. L., Krebs, S., Rainard, P., Schwartz-Cornil, I., Torny, D., Vayssier-Taussat, M., Zientara, S., Zundel, E. y Pineau, T. (2011). Issues and special features of animal health research. *Veterinary Research*, 42(1): 1-10.

Duque Osorio, J. (2017). Caracterización hematológica, morfométrica y química del tejido sanguíneo, de juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) mantenidas en un sistema biofloc y un sistema de recirculación de agua. Tesis doctoral. Corporación Universitaria Lasallista. Caldas, Antioquia, Colombia. 51 pp.

Ebeling, J. M., Timmons, M. B. y Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1–4): 346–358. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.019.

Ekasari, J. y Maryam, S. (2012). Evaluation of biofloc technology application on water quality and production performance of red tilapia *Oreochromis sp.* cultured at different stocking densities. *Hayati journal of Biosciences*, 19(2): 73-80.

Ekasari, J., Rivandi, D. R., Firdausi, A. P., Surawidjaja, E. H., Zairin, M., Bossier, P. y de Schryver, P. (2015). Biofloc technology positively affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae performance. *Aquaculture*, 441: 72–77. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.02.019.

Elayaraja, S., Mabrok, M., Algammal, A., Sabitha, E., Rajeswari, M. V., Zágoršek, K., Ye, Z., Zhu, S. y Rodkhum, C. (2020). Potential influence of jaggery-based biofloc technology at different C:N ratios on water quality, growth performance, innate immunity, immune-related genes expression profiles, and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 107: 118–128. doi: 10.1016/j.fsi.2020.09.023.

FAO. (2016). The state of world fisheries and aquaculture: contributing to food security and nutrition for all. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome. 204 pp.

Fernandes S, V. (2020). Produção integrada de camarão-branco-do-pacífico e tilápia-do-nilo em bioflocos suplementados ou não com microalga e ração para peixes. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil. 43 pp.

Ferreira, G. S., Santos, D., Schmachtl, F., Machado, C., Fernandes, V., Bögner, M., Schleder, D. D., Seiffert, W. Q. y Vieira, F. N. (2021). Heterotrophic, chemoautotrophic, and mature approaches in biofloc system for Pacific white shrimp. *Aquaculture*, 533: 736099. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736099.

Ferreira, N. C., Bonetti, C. y Seiffert, W. Q. (2011). Hydrological and water quality indices as management tools in marine shrimp culture. *Aquaculture*, 318(3): 425–433. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.05.045.

Fimbres-Acedo, Y. E. (2019). Acuicultura de *Oreochromis niloticus* en SAR y TBF integrada con horticultura hidropónica en sistemas sin recirculación. Tesis doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur, México. 211 pp.

Fimbres-Acedo, Y. E., Garza-Torres, R., Endo, M., Servín-Villegas, R., Fitzsimmons, K. M., Emerenciano, M. G. C. y Magallón-Barajas, F. J. (2019). Performance of *Oreochromis niloticus* in recirculating aquaculture systems at different levels of daily protein intake. *Aquaculture Research*, 50(11): 3326–3342. doi: 10.1111/are.14291

Fimbres-Acedo, Y. E., Magallón-Servín, P., Garza-Torres, R., Emerenciano, M. G. C., Servín-Villegas, R., Endo, M., Fitzsimmons, K. M. y Magallón-Barajas, F. J. (2020). *Oreochromis niloticus* aquaculture with biofloc technology, photoautotrophic conditions, and *Chlorella* microalgae. *Aquaculture Research*, 51(8): 3323–3346. doi: 10.1111/are.14668

Fournier, P., Dupuis, Y. y Tardivel, S. (1991). Effects of alkaline phosphatase inhibitors on intestinal transfer of calcium. *The International Journal of Biochemistry*, 23(2): 175-180.

Galvez, J. (2001). Biología reproductiva de la *Oreochromis niloticus*. Acuicultura y aprovechamiento del agua para el desarrollo rural. *International Center for Aquaculture and Aquatic Environments*. Auburn University, Alabama, United States of America. 1-7 pp.

García, J. G., Cruz, M. D., Rollan, C. M., Perez, C. P. y Alonso, A. G. (1995). Superoxide dismutase (SOD) and neutrophil infiltration in intestinal ischaemia-revascularization. *International Surgery*, 80(1): 95-97.

Gee, K. R., Sun, W. C., Bhalgat, M. K., Upson, R. H., Klaubert, D. H., Latham, K. A. y Haugland, R. P. (1999). Fluorogenic substrates based on fluorinated umbelliferones for continuous assays of phosphatases and β -galactosidases. *Analytical Biochemistry*, 273(1): 41-48.

Gonzalez-Silvera, D., Herrera, M., Giráldez, I. y Esteban, M. Á. (2018). Effects of the dietary tryptophan and aspartate on the immune response of meagre (*Argyrosomus regius*) after stress. *Fishes*, 3(1): 6. doi: 10.3390/fishes3010006.

Gularte-Vélez, C. A. (2020). Caracterización y evaluación de las propiedades inmunoestimulantes de la levadura *Kluyveromyces lactis* M3 y sus β -D- glucanos en peces. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur, México. 143 pp.

Gutiérrez, S. M., Monroy, C., Partida, H., Mejía, J. C. y Rodríguez, G. A. (2016). Effect of two carbon sources in microbial abundance in a biofloc culture system with *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(3): 421–427.

Hargreaves, J. A. (2013). Biofloc production systems for aquaculture. *Southern Regional Aquaculture Center*, (4503): 1–12.

Harris, H. (1989). The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta*, 186(2): 133–150. doi: 10.1016/0009-8981(90)90031-M.

Hernández-Mancipe, L. E., Londoño-Vélez, J. I., Hernández-García, K. A. y Torres-Hernández, L. C. (2019). Los sistemas biofloc: una estrategia eficiente en la producción acuícola. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14(1): 70-99.

Herrera, A. (2004). Perfil metabólico del salmón atlántico *Salmo salar* y trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* de tres pisciculturas en fase de agua dulce en el sur de Chile. Memoria de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 40 pp.

Hitzfeld, B. (2005). Fish Immune System. En: Vohr, H. W. Ed. *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-27806-0_574

Hrubec, T. C., Cardinale, J. L. y Smith, S. A. (2000). Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*, 29(1): 7-12.

Hernández-Mancipe, L. E., Londoño-Vélez, J. I., Hernández-García, K. A. y Torres-Hernández, L. C. (2019). Los sistemas biofloc: una estrategia eficiente en la producción acuícola. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14(1): 70-99.

Hurtado, N. (2005). Inversión sexual en tilapias. *Revisión Bibliográfica*, 1–43.

Institute for Quality and Efficiency in Health Care. (2019). What does blood do?. Informed Health Organization. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279392/> [consulta: 30 abril 2021].

Instituto Nacional de Pesca. (2018). *Acuicultura Tilapia*. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-tilapia> [consulta: 23 de abril 2021].

Jung, J. Y., Damusaru, J. H., Park, Y., Kim, K., Seong, M., Je, H. W., Kim, S. y Bai, S. C. (2017). Autotrophic biofloc technology system (ABFT) using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* positively affects performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Algal Research*, 27: 259–264. doi: 10.1016/j.algal.2017.09.021.

Kim, K., Hur, J. W., Kim, S., Jung, J. Y. y Han, H. S. (2020). Biological wastewater treatment: comparison of heterotrophs (BFT) with autotrophs (ABFT) in aquaculture systems. *Bioresource Technology*, 296: 122293. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122293.

Kuhn, D. D., Boardman, G. D., Lawrence, A. L., Marsh, L. y Flick Jr, G. J. (2009). Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture*, 296(1-2): 51-57.

Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Swain, H. S. y Das, B. K. (2021). Biofloc microbiome with bioremediation and health benefits. *Frontiers in Microbiology*, 3499.

Lima, E. C. R. D., Souza, R. L. D., Wambach, X. F., Silva, U. L. y Correia, E. D. S. (2015). Culture of the Nile tilapia "*Oreochromis niloticus*" in biofloc system with different stocking densities. *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal*, 16(4): 948–957. doi: 10.1590/s1519-99402015000400018.

Liu, J. Y., Li, A. H., Ji, C. y Yang, W. M. (2009). First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4): 314-320.

Long, L., Yang, J., Li, Y., Guan, C. y Wu, F. (2015). Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 448: 135–141. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.017.

Maguregui, E. (2020). *Fish immune system: how to improve aquaculture production through immunity*. Disponible en: https://www.veterinariadigital.com/en/articulos/fish-immune-system-how-to-improve-aquaculture-production-through-immunity/#Primary_and_secondary_lymphoid_organs [consulta: 24 de enero 2022]

Mansour, A. T. y Esteban, M. Á. (2017). Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 64: 202–209. doi: 10.1016/j.fsi.2017.03.025.

Martínez-Cordero, F. J., Delgadillo, T. S., Sánchez-Zazueta, E. y Cai, J. (2021). Tilapia aquaculture in Mexico: assessment with a focus on social and economic performance. *Fisheries and Aquaculture*, 1219. <http://doi.org/10.4060/cb3290en>.

McCord, J. M. y Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 244(22): 6049-6055.

Menaga, M., Felix, S., Charulatha, M., Gopalakannan, A. y Panigrahi, A. (2019). Effect of in-situ and ex-situ biofloc on immune response of genetically improved farmed tilapia. *Fish and Shellfish Immunology*, 92: 698–705. doi: 10.1016/j.fsi.2019.06.031.

Monroy-Dosta, M del C., de Lara, R. A., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G. y Coelho-Emerenciano, M. G. (2013). Microbiology community composition and abundance associated to biofloc in tilapia aquaculture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(3): 511–520. doi: 10.4067/s0718-19572013000300009.

Parrilla-Taylor, D. P., Zenteno-Savín, T. y Magallón-Barajas, F. J. (2013). Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 380: 41-46.

Peng, K., Chen, X., Wei, D., Zhao, L., Chen, B., Mo, W., Zheng, C. y Sun, Y. (2020). Inclusion of Chlorella water extract in Oreochromis niloticus fingerling diets: effects on growth performance, body composition, digestive enzyme activity, antioxidant and immune capacity, intestine and hepatic histomorphology and sodium nitrite stress resistance. *Aquaculture Reports*, 18: 100547. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100547.

Pérez M., Sáenz, M. y Martínez E. (2015). Crecimiento de las tilapias *Oreochromis niloticus* en cultivo monosexual y ambos sexos, en sistemas de producción semi-intensivos. *Revista Científica de la UNAN-León*, 6(1): 72–79. doi: 10.5377/universitas.v6i1.13697.

Pérez-Rostro, C. I., Pérez-Fuentes, J. A. y Hernández-Vergara, M. (2014). Biofloc, a technical alternative for culturing malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii*. En M. P. H. Vergara y C. I.

Pérez-Rostro (eds.). *Sustainable Aquaculture Techniques*. IntechOpen, London. 10.5772/57501.

Pérez, T., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I. y Múzquiz, J. L. (2010). Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology*, 3(4): 355-360.

Reyes-Becerril, M., Guluarte, C., Ceballos-Francisco, D., Angulo, C. y Esteban, M. Á. (2017). Dietary yeast *Sterigmatomyces halophilus* enhances mucosal immunity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 64: 165–175. doi: 10.1016/j.fsi.2017.03.027.

Ríos, M. V., Guzmán-Guillén, R., Prieto, A. I., Moreno, I. M. y Cameán, A. M. (2013). Alteración de biomarcadores de estrés oxidativo en tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a dosis repetidas de cilindrospermopsina por diferentes vías de exposición. *Revista de Toxicología*, 30(2): 149-160.

Saavedra-Martínez, M.A. (2006) Manejo del Cultivo de Tilapia. Facultad de Ciencia, Tecnología y Ambiente, Universidad Centroamericana, Managua, Nicaragua. Disponible en: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADK649.pdf [consulta: 24 de enero 2022].

Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J. C, Ottengraf, S. y Amann, R. (1999). Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale

gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8): 3690-6. doi: 10.1128/AEM.65.8.3690-3696.1999.

Silva, V. F., Pereira, P. K. M., Martins, M. A., Lorenzo, M. A D., Cella, H., Lopes, R. G., Derner, R. B., Magallón-Servín, P. y Vieira, F. D. N. (2022). Effects of microalgae addition and fish feed supplementation in the integrated rearing of Pacific white shrimp and Nile tilapia using biofloc technology. *Animals*, 12(12): 1527. doi: 10.3390/ani12121527.

Sorhouet, E. E. G. (2015). Respuesta fisiológica e inmune del camarón *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones de alta densidad e hipoxia aguda, en presencia de flóculos biológicos y sustratos artificiales durante la precría. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur, México. 183 pp.

Stroud, R. M. (1974). Proteins that. *Scientific American*, 231(1): 74–88.

Toledo-Cuevas, E.M., Moyano López, F.J., Tovar Ramírez, D., Álvarez González, C.A., Strüssmann, C.A., Martínez-Chávez, C.C. y Martínez Palacios, C.A. (2011). Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*, 42(6): 776-786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02853.x>

Wang, F. y Zhang, Y. Q. (2015). Bioconjugation of silk fibroin nanoparticles with enzyme and peptide and their characterization. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 98: 263-291. doi: 10.1016/bs.apcsb.2014.11.005.

Wang, Y. B. (2007). Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269(1-4): 259-264.

Zapata, K. P. L., Brito, L. O., de Lima, P. C. M., Vinatea, L. A. A., Galvez, A. O. y Cárdenas, J. M. V. (2017). Cultivo de alevinos de tilapia em sistema de bioflocos sob diferentes relações carbono/nitrogênio. *Boletim do Instituto de Pesca*, 43(3): 399–407. doi: 10.20950/1678-2305.2017v43n3p399.