Hidrobiológica 2025, 35 (2): 117-128

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Unidad Iztapalapa
Casa abierta al tiempo

HIDROBIOLÓGICA
http:/hidrobiologica.izt.uam.mx
ISSN: 2448-7333

OPEN ACCESS
Research Article
August, 2025

Efecto de la suplementación de dos tipos de biomasa microbiana adicionadas a bajos niveles sobre el crecimiento, asimilación y protección hepática en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Effect of two types of microbial biomass added at low dietary levels on growth, assimilation and hepatic protection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Lourdes Xochipa Hernández[1], Oscar Daniel García Pérez[1*], Julio César Cruz Valdez[1], Julián Gamboa Delgado[2], Hugo Bernal Barragán[3], David Alonso Villarreal Cavazos[2].

Recibido: 07 de octubre de 2024. ***Aceptado:*** 07 de febrero de 2025. ***Publicado:*** agosto de 2025.

[1] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León Nuevo León. Av. Fco. Villa S/N, Col. Ex-Hacienda El Canadá, General Escobedo, Nuevo León, 66050. México.

[2] Programa Maricultura, Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Pedro de Alba s/n, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66455. México.

[3] Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Fco. Villa S/N, Col. Ex-Hacienda El Canadá, General Escobedo, Nuevo León, 66050. México.

***Corresponding author:**
Oscar Daniel García Perez: e-mail: oscar_garcia83@hotmail.com; oscar.garciapr@uanl.edu.mx

To quote as:
Xochipa Hernández, L., O. D. García Perez, J. C. Cruz Valdez, J. Gamboa Delgado, H. Bernal Barrágan & D. Alonso Villarreal Cavazos. 2025. Efecto de la suplementación de dos tipos de biomasa microbiana adicionadas a bajos niveles sobre el crecimiento, asimilación y protección hepática en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Hidrobiológica* 35 (2): 117-128.

DOI:10.24275/RSMF5717

RESUMEN

Objetivos. Se diseñó un experimento nutricional en el cual se evaluó el efecto de la sustitución parcial de harina de pescado (HP) por biomasa bacteriana y espirulina (*Arthrospira platensis*) sobre el crecimiento, asimilación de nutrientes y protección hepática en tilapia del Nilo. **Métodos.** Se formularon cinco tratamientos (dietas isoprotéicas e isoenergéticas): La dieta control consistió en 100% de la proteína aportada por HP, los tratamientos 97HP:3AP y 94HP:6AP consistieron en 3 y 6%, respectivamente, de proteína aportada por *Arthrospira* y 97HP:3BB y 94HP:6BB en 3 y 6%, respectivamente, de la proteína aportada por biomasa bacteriana. Se utilizaron 320 alevines (0.8±0.05 g peso inicial), distribuidos en 16 organismos por acuario (4 acuarios por tratamiento). Durante 28 días se ofreció alimento *ad libitum* en tres porciones por día, iniciando con 10% de la biomasa del acuario. **Resultados y conclusiones.** Los parámetros de rendimiento entre tratamientos fueron similares. Los valores isotópicos del nitrógeno determinados en los ingredientes experimentales y en tejido muscular de los peces permitió estimar la asimilación proporcional relativa del nitrógeno dietario aportado por los ingredientes experimentales. Se observó que, incluso a los niveles evaluados, ambas fuentes microbianas aportaron nitrógeno estructural durante la biosíntesis de músculo. Al evaluar el grado de protección hepática conferido por los ingredientes en peces expuestos a diésel, todos los tratamientos presentaron un incremento en la actividad de la enzima carboxilesterasa. En cambio, la actividad de glutatión-S-transferasa, se incrementó solamente en los peces que consumieron las dietas con 3 y 6% de espirulina. La adición de las fuentes microbianas en la mayoría de los casos promovió respuestas fisiológicas positivas al observarse que los niveles de expresión enzimática no presentaron alteraciones significativas.

Palabras clave: tilapia del Nilo, biomasa microbiana, *Arthrospira*, isótopos estables, actividad enzimática

ABSTRACT

Goals. A feeding experiment was designed to evaluate the effect of partial replacement of fishmeal (HP) with bacterial biomass and spirulina (*Arthrospira platensis*) on the growth, nutrient assimilation, and liver protection in Nile tilapia. **Methods.** Five diets (isoproteic and isoenergetic) were formulated: The control diet consisted of 100% of the protein provided by HP; treatments 97FM:3AP and 94FM:6AP consisted of 3 and 6%, respectively, of protein provided by *Arthrospira*; and 97FM:3BB and 94FM:6BB consisted of 3 and 6%, respectively, of protein derived from a bacterial biomass. 320 fingerlings (0.8 ± 0.05 g initial weight) were selected and distributed at 16 organisms per tank (4 tanks per treatment). Fish were fed *ad libitum* for 28 days, in three portions per day and starting with 10% of the estimated fish biomass. **Results and conclusions:** performance parameters were similar among treatments. The nitrogen isotopic values determined in the experimental ingredients and fish muscle tissue allowed estimating the relative proportional assimilation of nutrients derived from the different ingredients. It was observed that, even at the evaluated levels, both microbial sources contributed with structural nitrogen during muscle biosynthesis. When evaluating the degree of liver protection conferred by the ingredients in fish exposed to diesel, all treatments showed an increase in carboxylesterase enzyme activity. In contrast, glutathione-S-transferase activity increased only in fish that consumed the diets with 3 and 6% spirulina. The addition of microbial sources in most cases promoted positive physiological responses as it was observed that enzyme expression levels remained stable.

Keywords: Nile tilapia, micriobial biomass, *Arthrospira*, stable isotopes, enzyme activity

INTRODUCCIÓN

La producción acuícola ha tenido un crecimiento significativo en los últimos años, superando a la producción pesquera tradicional y consolidándose como uno de los sectores de producción de alimentos más adaptables a diferentes condiciones (FAO, 2022). Una especie clave para el crecimiento de la acuacultura en el ámbito mundial es la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758). Debido a su tolerancia a diferentes factores ecológicos y ambientales, ya que se adapta tanto a climas tropicales como subtropicales, además, presenta un rápido crecimiento y aumento de masa muscular, contribuyendo de manera significativa a mejorar los medios de vida en diferentes partes del mundo donde se cultiva (Munguti *et al.,* 2022). Sin embargo, un punto crítico para incrementar la producción acuícola es la alimentación, ya que este rubro representa entre el 40 al 60% de los gastos operacionales, por lo tanto, la integración de fuentes proteicas alternativas a la harina de pescado es fundamental para garantizar la sostenibilidad económica y ambiental de la industria (Jabir *et al*., 2012; Kirimi *et al*., 2016). Para mitigar la problemática asociada al uso de harina de pescado y maximizar el rendimiento de los alimentos acuícolas, se ha explorado el uso de aditivos o ingredientes integrados en la dieta en pequeñas cantidades, como estrategia de mejorar la eficiencia nutricional y promover el crecimiento de los peces (Alemayehu *et al*., 2018). Entre las soluciones más innovadoras se encuentran el uso de ingredientes unicelulares.

La biomasa microbiana se refiere a un conjunto de microrganismos que incluyen bacterias, microalgas y levaduras, organismos que son actualmente producidos utilizando diferentes sustratos novedosos, como desechos agrícolas y efluentes de industrias alimentarias (Gamboa-Delgado *et al*., 2017). Los resultados de la incorporación de biomasa microbiana en la alimentación de especies acuícolas indican que en especies tales como salmón, *Salmo salar* (Romarheim *et al.,* 2011), camarón tigre, *Penaeus monodon* (Glencross et al. 2014) y trucha, *Oncorhynchus mykiss* (Teimouri *et al.,* 2013), se mejoran los parámetros de crecimiento debido al alto contenido proteico de los microorganismos (65-82%). Adicionalmente, muchas especies de microorganismos contienen perfiles de aminoácidos esenciales ideales, además de aportar ácidos grasos, vitaminas y minerales, demostrado así un gran potencial al mejorar la salud y el rendimiento en organismos acuáticos, sin embargo, la información acerca del papel protector ante la presencia de xenobióticos es limitada (Xu *et al*., 2021).

La espirulina *Arthrospira platensis* es una cianobacteria filamentosa, que habita en aguas tropicales y salinas con un pH alcalino (9.5). Ha sido utilizada en dietas acuícolas como fuente alterna de proteína y como ingrediente funcional debido a su buen contenido de macro y micronutrientes (hierro, vitamina $B_{12,}$ β-caroteno, clorofila, ficocianina y antioxidantes) (Pakravan *et al*., 2017; Plaza *et al*., 2018; Darwish *et al*., 2020). Su contenido proteico oscila entre el 60 y 70% (Macias-Sancho *et al*., 2014) y el contenido de aminoácidos esenciales representa hasta el 47% de la proteína total (Soni *et al*., 2017). La espirulina *A. platensis* se utiliza como fuente proteica para la alimentación animal y se valoran sus propiedades inmuno-protectoras, que reducen la susceptibilidad a los efectos nocivos de los contaminantes ambientales (Diniz *et al*., 2024), además de modular la respuesta inmune (Abdel-Tawwab & Ahmad, 2009).

Para validar la eficiencia de las fuentes proteicas en acuacultura, se debe evaluar su eficiencia digestiva y aprovechamiento para el incremento de biomasa, además de la palatabilidad (Alves *et al*., 2020), la digestibilidad aparente (Arriaga-Hernández *et al*., 2021) y la asimilación de nutrientes por medio de diversos biomarcadores. El uso de isótopos estables emerge como una técnica alternativa que aporta valiosa información sobre el aprovechamiento de los nutrientes por diversos ingredientes alternativos, que pueden apoyar la sustentabilidad de la nutrición acuícola (Gamboa-Delgado, 2022). La técnica de determinaciones isotópicas en sistemas acuícolas permite generar información relevante acerca de la utilización fisiológica de los nutrientes aportados por diversos ingredientes alternativos. La técnica también se utiliza para explorar el flujo de nutrientes y energía en diversos ecosistemas y la asimilación proporcional de nutrientes específicos (típicamente carbono y nitrógeno dietario) presentes en diversos ingredientes y en los tejidos de los consumidores (García-Pérez *et al*., 2018). Winter *et al.* (2019) reportaron cambios isotópicos exponencial en organismos acuáticos de rápido crecimiento, lo cual facilita su uso como trazadores nutricionales.

Diversos investigadores han evaluado biomarcadores enzimáticos como la Glutatión S-transferasa (GST), Fosfatasa Alcalina (ALP) y Carboxilesterasa (CE) como indicadores sensibles de la magnitud de los efectos tóxicos inducidos por un xenobiótico (Aguilera-González *et al*., 2015; Park *et al*., 2020). Se propone que la adición de ingredientes alternativos como biomasa bacteriana y espirulina *A. platensis*, puede modular la respuesta de estos biomarcadores enzimáticos, al atenuar efectos tóxicos. Aguilera-González *et al.* (2015) expusieron por medio de inyección intraperitoneal una dosis controlada de un xenobiótico, con la finalidad de provocar cambios significativos en la actividad de enzimas hepáticas de detoxificación sin causar mortalidad en los peces.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto dietario de la sustitución parcial de harina de pescado por biomasa bacteriana y espirulina (*Arthrospira platensis*) sobre parámetros de rendimiento, su digestión y asimilación por medio de mediciones de isótopos estables. Además, analizar la actividad enzimática de la GST, ALP y CE como indicadores de función hepática ante la presencia de un xenobiótico (diésel).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y condiciones del bioensayo

Para el estudio se usaron 320 alevines de tilapia del Nilo con un peso inicial de 0.8± 0.05 g. Los peces fueron seleccionados a partir de un lote de alevines obtenido de una unidad de producción acuícola en La Antigua, Veracruz, México. Los peces se transportaron al laboratorio de producción acuícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, donde se mantuvieron durante cinco días como un periodo de aclimatación en acuarios de cristal y un fotoperíodo natural de 12-12 horas luz-oscuridad. Durante la aclimatación y bioensayo se mantuvieron los siguientes parámetros de calidad del agua: temperatura: 28 ± 2°C; pH: 8.4 ± 0.2; nitrógeno amoniacal: 0.09 ± 0.04 mg L^{-1}; el nitrito se mantuvo en niveles inferiores a su detección, y los valores de nitrato fueron de 10.5 ± 0.04 mg L^{-1}**.** El bioensayo de alimentación se dispuso como un diseño completamente aleatorio en el cual los alevines se distribuyeron a razón de 16 organismos por acuario (con una capacidad de 120 L), configurando 4 replicados por tratamiento.

Dietas Experimentales

Durante la aclimatación, los peces fueron alimentados con una dieta comercial (NutriPec, Purina® con 44% de proteína cruda y 15% de lípidos), cuya composición bromatológica e isotópica se determinó previo a su uso mediante procedimientos estandarizados (método Kjeldahl 960.52 para proteína, método 920.39 para grasa utilizando un extractor tipo Soxhlet, método 942.05 para cenizas [AOAC, 2006] y análisis isotópico de nitrógeno como se describe en Gamboa-Delgado *et al*. [2020]). Esta dieta de aclimatación permitió establecer un valor isotópico inicial (basal) en el músculo de todos los organismos antes de que las dietas experimentales fueran diversificadas.

Para el estudio se formularon y prepararon cinco dietas experimentales (Tabla 1), en las que se usó como fuentes de proteína harina de pescado ([HP] sardina Monterrey), harina de espirulina, *A. platensis* ([AP], con 63% proteína) y una biomasa bacteriana comercial, ProFloc™ – Nutrinsic Inc. ([BB], con 68% proteína). Las cinco dietas fueron iso-nitrogenadas (40.5% de proteína cruda) e iso-energéticas (4.9 kcal/g) y correspondieron a los cinco tratamientos aplicados (Tabla 2). La dieta control contenía solo harina de pescado (100HP) como fuente de nitrógeno. A cuatro dietas más se les incluyó 3 y 6% de harina de espirulina *A. platensis* (97HP:3AP; 94HP:6AP), o 3 y 6% de biomasa bacteriana (97HP:3BB; 94HP:6BB), estimando en función del nitrógeno disponible (Tabla 2). A partir del inicio del bioensayo, se sustituyó la dieta comercial por las experimentales, las cuales se proporcionaron *ad libitum* tres veces al día (9:00, 13:00 y 17:00 h). El alimento no consumido y las heces se retiraron diariamente de las unidades experimentales, en la mañana, antes de la primera alimentación.

Parámetros de crecimiento y recolección de muestras

Al final del periodo experimental de 28 días, se determinó el peso individual de los peces utilizando una balanza analítica (A&D Company®, modelo: Fx-2000i), con capacidad máxima de 2200 g y división mínima de 0.01 g. Previo al pesado de los peces, se eliminó parte de la humedad con una tela absorbente. Los parámetros de rendimiento fueron medidos siguiendo métodos reportados previamente (García-Pérez *et al*., 2022), con la finalidad de determinar los efectos de la incorporación de los ingredientes.

Para determinar los cambios isotópicos promovidos por las diferentes dietas en el tejido muscular de los peces, se realizaron muestreos de tejido muscular en los días experimentales 0, 3, 7, 14, 21 y 28. En cada muestreo se tomó un pez por réplica y se sacrificó mediante inmersión en agua con hielo, para posteriormente diseccionar y obtener el tejido muscular siguiendo la metodología utilizada por García-Pérez *et al*. (2018). En el día final del bioensayo, todos los peces fueron sacrificados de la forma previamente descrita. Posteriormente, se disectaron los peces a fin de extraer el músculo lateral y finalmente muestras de músculo, ingredientes proteicos y dietas experimentales, fueron deshidratadas a 60 °C durante 24 h, en un horno de convección. Las muestras se sometieron a molienda con un mortero y pistilo y se almacenaron en un desecador, hasta su pretratamiento para el análisis de isótopos estables.

Análisis elemental y análisis de isótopos estables

Las dietas, ingredientes proteicos y muestras de músculo previamente secas y molidas fueron pesadas (1.0 ± 0.1 mg) y se empaquetaron individualmente en microcápsulas de estaño, las cuales a su vez se colocaron en microplacas de 96 pocillos. Los análisis isotópicos se realizaron en la Stable Isotope Facility de la Universidad de California (Davis, CA, USA), siguiendo el método descrito por García-Pérez *et al.* (2018). Los valores isotópicos fueron estimados a partir del valor estándar del valor isotópico ($\delta^{15}N$) del material de referencia (nitrógeno atmosférico) y los resultados fueron expresados en notación delta (δ), definida como partes por mil (‰).

Estimación de la contribución nutrimental y tiempo de residencia de nitrógeno

Las contribuciones proporcionales del nitrógeno dietario al crecimiento de los peces se estimaron a partir de los valores isotópicos analizados, utilizando un modelo de mezclado isotópico para dos fuentes nutricionales y un isótopo (Phillips & Gregg, 2001). El modelo considera las diferencias isotópicas entre las fuentes dietarías (harina de pescado y fuentes microbianas) y el consumidor (en este estudio representado por el tejido muscular de los peces), así como el tamaño de la muestra y la variabilidad isotópica entre muestras. Los cambios isotópicos provocados por las dietas experimentales se registraron durante el bioensayo y al final se calcularon los factores de discriminación isotópica, definidos como las diferencias en los valores isotópicos entre los consumidores y sus respectivas dietas después de alcanzar un equilibrio isotópico [$\Delta^{15}N$].

Los valores isotópicos determinados en peces alimentados con la dieta consistente en harina de pescado como única fuente de proteína fueron tomados como valores isotópicos de referencia en el modelo de mezclado isotópico. Dado que no se manufacturaron dietas conteniendo solamente biomasa bacteriana o espirulina de *A. platensis*, se consideraron como valores de discriminación isotópica los resultados obtenidos previamente en laboratorio, teniendo en cuenta los requisitos de aplicación asociados al uso de modelos de mezclado isotópico, tales como la verificación de valores isotópicos contrastantes en los ingredientes y el alcance de un equilibrio isotópico entre consumidores y dietas.

Los valores isotópicos registrados a los diferentes tiempos se integraron a un modelo exponencial de cambio (Eq. 1, Hesslein *et al*., 1993) el cual permitió diferenciar los cambios isotópicos causados por el crecimiento (*k*) y la tasa de recambio metabólica (*m*).

$$C_{muestra} = C_n + (C_o - C_n)e^{-(k+m)t} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

Donde $C_{muestra}$ es el valor isotópico en el tejido del pez en determinado tiempo *t*, es el valor isotópico del tejido del organismo consumidor al estar en C^o equilibrio con la dieta inicial (dieta de aclimatación del presente estudio), y C^n es el valor isotópico alcanzado cuando el pez está en equilibrio con la nueva dieta (dietas experimentales en el presente estudio).

Tabla 1. Análisis proximales de las fuentes de proteína utilizadas para la elaboración de las dietas experimentales.

Ingredientes	Harina de pescado (Alimentos Costamar®)	Arthrospira platensis (Agrovitae®)	Biomasa bacteriana (ProFloc™)
Materia Seca (%)	92.11	92.27	74.64
Proteína (%/BS)	68.28	63.95	68.64
Lípidos (%)	8.15	1.05	10.26
Cenizas	15.64	9.19	21.3

La constante de crecimiento, representada por *k*, se obtuvo ajustando un modelo de crecimiento exponencial a los datos de peso observado, *k= log* (peso final/ peso inicial) / tiempo (días), mientras el parámetro *m* se estimó mediante regresión no-lineal iterativa. Una vez estimados los dos últimos coeficientes, fue posible estimar el periodo de tiempo necesario para que la mitad del nitrógeno sea remplazado en el tejido muscular (t_{50} ó tiempo medio, Eq 2; MacAvoy *et al.*, 2005)

$t_{50}=ln2 / m+k$ (Eq. 2)

Evaluación de biomarcadores enzimáticos

Con el propósito de evaluar el efecto de las dietas experimentales adicionadas con 3 y 6% de espirulina o biomasa bacteriana, y de la dieta control de harina de pescado, a la exposición a un xenobiótico de tipo hidrocarburo (diésel) en los peces del presente estudio, al finalizar el período de alimentación, se seleccionaron aleatoriamente 20 peces de cada tratamiento, de los cuales a 10 se les aplicó una inyección intraperitoneal de diésel (variante 305-82 PEMEX) disuelto previamente en aceite vegetal puro de soya a una dosis no letal de 50 μg/kg (tratamiento D). Otros 10 peces de cada tratamiento fueron inyectados con aceite vegetal puro de soya sin diésel (tratamiento A) los cuales fungieron como tratamiento control. Se utilizaron jeringas nuevas por cada pez durante la aplicación. La dosis aplicada del xenobiótico en el presente estudio, así como el método y el período de exposición fueron establecidos de acuerdo con lo reportado por Aguilera-González *et al.* (2015).

Los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bienestar Animal de la FMVZ-UANL número de folio: 36/2022.

Preparación de muestras y análisis de actividad enzimática

En el presente estudio se determinaron los niveles de actividad de enzimas hepáticas (CE, GST y ALP), comúnmente utilizadas como biomarcadores de estrés por exposición a xenobióticos (Al-Ghais *et al.,* 2000; Napierska *et al.*, 2006; Nandurkar, 2017).

Tabla 2. Formulación nutrimental (g/1000 g de dieta) de cinco dietas experimentales para la tilapia del Nilo utilizadas para evaluar la contribución de nutrientes suplementados por la harina de pescado (HP), *Arthrospira platensis* (AP) y biomasa bacteriana (BB) para el crecimiento de los peces. Además, se incluye la composición proximal y valor isotópico de cada una de las dietas.

Dieta (g/kg)	Control	97HP:3AP	94HP:6AP	97HP:3BB	94HP:6BB
HP, sardina[a]	615	605	580	600	590
Fécula de maíz[b]	286	267	281	250	258
Aceite de pescado[c]	95	105	100	110	100
Arthrospira platensis[d]	0	18	35	0	0
Biomasa bacteriana (ProFloc™)[e]	0	0	0	16	28
Celulosa[f]	0	1	0	20	20
CMC[g]	10	10	10	10	10
Premezcla de vitaminas[h]	2	2	2	2	2
Premezcla de minerales[h]	2	2	2	2	2
Analisis proximal e isotopica					
Proteína cruda (%)	39.0 ± 0.01	41.2 ± 0.16	42.1 ± 1.41	38.0 ± 2.19	42.9 ± 0.80
Lípidos (%)	14.9 ± 0.31	16.2 ± 0.23	15.4 ± 0.03	16.1 ± 0.16	15.3 ± 0.03
Fibra cruda (%)	6.6 ± 0.89	8.3 ± 1.56	7.2 ± 0.26	7.3 ± 0.13	6.9 ± 0.04
Cenizas (%)	9.0 ± 0.14	10.2 ± 0.91	10.7 ± 0.23	11.2 ± 1.83	9.2 ± 0.34
$\delta^{15}N$ (‰)	16.5 ± 0.22	15.1 ± 0.30	15.7 ± 0.17	15.6 ± 0.25	16.0 ± 0.19

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

Después de la exposición, los peces se mantuvieron vivos en sus respectivos acuarios durante 24 horas. Posteriormente fueron sacrificados por hipotermia y se recolectaron muestras de hígado de cada pez las cuáles se almacenaron en ultracongelación a -70ºC para su posterior análisis de actividad enzimática.

Para obtener los extractos enzimáticos, las muestras de hígado fueron homogenizadas en agua bidestilada en una proporción 1:10 (peso de muestra: volumen agua) utilizando un mortero en frío (4ºC) durante 4 minutos. Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 2,000 g durante 15 minutos en una centrifuga con control de temperatura (4ºC). El sobrenadante fue separado de la capa superior de lípidos y del precipitado y fue almacenado en alícuotas de 0.1 mL en tubos criogénicos a ultracongelación (-70ºC) para su uso posterior como extractos enzimáticos.

La concentración de proteína en los extractos enzimáticos fue determinada mediante el método de Bradford, utilizando suero de albúmina bovina (BSA) como proteína estándar (Bradford, 1976). La actividad de CE se determinó en microplacas según la metodología descrita por Aguilera-González *et al*. (2015). La mezcla de reacción consistió en 200 µL de buffer tris-HCl 50 mM (pH 7,1), 10 µL de extracto y 100 µL de 4 nitrofenilo acetato 2 mM como sustrato para iniciar la reacción. La absorbancia se registró inmediatamente a 405 nm y durante un lapso de 10 minutos a intervalos de 120 segundos, en un lector de microplacas EPOCH (Biotek, Vermont, EE. UU.). Para cada muestra se realizaron tres réplicas analíticas; en los controles se reemplazó la muestra por buffer. Se verificó la linealidad de la reacción, y la actividad enzimática se expresó como µmol min^{-1} mg de $proteína^{-1}$, utilizando un coeficiente de extinción molar de p-nitrofenol de 18,5 mM^{-1} cm^{-1}.

La actividad de ALP se determinó en microplacas utilizando fosfato de 4-nitrofenilo como sustrato (Mazorra *et al*., 2002). Para la reacción se agregaron 200 µL de buffer dietanolamina (1.0 M) con $MgCl_2$ 50 mM (pH 9.8), luego se agregaron 10 µL del extracto enzimático y 10 µL del sustrato a una concentración final de 0.4 mM. Se realizaron lecturas de absorbancia a 405 nm, con las mismas condiciones que las realizadas para la medición de CE. La actividad enzimática se expresó como µmol min^{-1} mg de $proteína^{-1}$ utilizando para el coeficiente de extinción molar de 4-nitrofenilo de 18,5 mM^{-1} cm^{-1}.

La actividad GST se determinó mediante método adaptado a microplacas (Barriga-Vallejo *et al*., 2017). Para la reacción se agregó un volumen de 300 µL de mezcla de sustrato conteniendo L-glutatión reducido (200 mM) y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB; 100 mM) en solución salina de buffer de fosfatos Dulbecco (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 136.9 mM NaCl y 8.9 mM $Na_2HPO_4 \bullet 7H_2O$, pH 7.2) y 10 µL de extracto enzimático para iniciar la reacción. Inmediatamente se registró la absorbancia a 340 nm cada minuto durante un período de 10 minutos. La actividad de GST se expresó como µmol min^{-1} mg de $proteína^{-1}$, utilizando un coeficiente de extinción molar de 5.3 mM^{-1} cm^{-1} para CDNB.

Análisis estadístico

Una vez confirmada la distribución normal de los datos y la homocedasticidad, los parámetros de producción y las diferentes actividades enzimáticas (CaE, ALP y GST) obtenidas a partir de cada tratamiento se compararon mediante pruebas ANOVA de una vía. En caso de detección de diferencias significativas, estas fueron identificadas mediante pruebas de comparaciones múltiple de medias (Tukey). Las proporciones esperadas de nitrógeno dietario (es decir, las establecidas mediante la formulación en las diferentes dietas) y las proporciones respectivas de nutrientes realmente asimiladas (proporciones observadas) en el tejido muscular del organismo consumidor, se compararon mediante pruebas de bondad de ajuste Chi-cuadrada (X^2). Los tiempos medios de residencia elemental en el tejido muscular (valores t_{50}) se compararon mediante pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el software SPSS 17.0 (SPSS Inc.) a un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Parámetros de crecimiento

Al final del experimento se observó que la supervivencia de los organismos sometidos a los diferentes tratamientos fue superior al 96%. El peso final (17.5 a 18.5 g) y la ganancia de peso (2084 a 2165%) de los peces fue estadísticamente similar (P>0.05) entre los tratamientos. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros de rendimiento de los diferentes tratamientos, se pudo observar que los peces alimentados con la dieta 97HP:3AP tuvieron un promedio mayor en la ganancia de peso, mientras que los pertenecientes a la dieta 94HP:6BB promediaron el menor peso de todos los tratamientos (Tabla 3).

Estimación de la contribución nutrimental y tiempo de residencia de nitrógeno

Debido a la influencia isotópica de la dieta de acondicionamiento, se estableció un valor isotópico basal de $\delta^{15}N$ = 10.4 ‰ en el organismo completo. Después del inicio del experimento y una vez que las dietas se diversificaron, se observó que los valores isotópicos en músculo experimentaron un rápido cambio exponencial, indicando una rápida asimilación de nutrientes en el tejido del pez, a su vez provocada por las dietas experimentales (Fig.1). Los valores $\delta^{15}N$ de la biomasa bacteriana y la espirulina *A. plantensis* fueron 4.89 ± 0.05 y 3.69 ± 0.04 ‰ respectivamente, mientras que para la harina de pescado fue de $\delta^{15}N$ = 16.50 ± 0.20 ‰. La diferencia isotópica entre los principales ingredientes facilitó la estimación de sus contribuciones dietarías. Para el día experimental 16, se observó un equilibrio isotópico entre la harina de pescado (dieta 100HP) y el tejido muscular de los peces que consumieron esta dieta. Los resultados mostrados en la Tabla 5 indican que existió una mejor asimilación de nitrógeno derivado de la biomasa bacteriana ProFloc™ (BB) al implementar una inclusión dietaría del 3% comparado con el 6%. Por otro lado, las contribuciones de nitrógeno por *A. platensis* (AP) mostraron una asimilación inferior a las establecidas en las formulaciones de las dietas. La integración de los valores isotópicos en el modelo de cambio exponencial indicó que el crecimiento (*k*) fue el componente principal que promovió el cambio isotópico en el organismo consumidor (74-86%), en contraste con la influencia isotópica causada por la tasa de recambio metabólico (*m*) del nitrógeno en tejido muscular, la cual contribuyó en menor proporción al cambio isotópico (14-26%). Utilizando los valores de *k* y *m*, fue posible estimar el tiempo medio (t_{50}) de residencia de nitrógeno en tejido y se encontró que estos t_{50} oscilaron entre 4.9 a 5.7 días, observándose una ligera tendencia a aumentar en los tratamientos con BB y con el alimento control (Tabla 4).

Tabla 3. Parámetros zootécnicos de la tilapia del Nilo alimentados con los diferentes tratamientos.

Dieta experimental	Peso final (g)	Ganancia de peso (g)	Tasa de crecimiento (%)	Tasa de conversion alimenticia	Sobrevivencia (%)
100HP	17.7 ± 1.56	16.9 ± 1.55	2085 ± 148	1.06 ± 0.12	100 ± 0
97HP:3AP	18.2 ± 0.86	17.4 ± 0.86	2151 ± 121	1.13 ± 0.20	100 ± 0
94HP:6AP	17.5 ± 3.82	16.7 ± 3.83	2077 ± 490	1.27 ± 0.19	100 ± 0
97HP:3BB	18.1 ± 0.76	17.3 ± 0.76	2165 ± 87	1.03 ± 0.12	100 ± 0
94HP:6BB	17.5 ± 0.83	16.7 ± 0.82	2084 ± 97	1.21 ± 0.14	97.5 ± 2.5
sig.	0.961	0.958	0.915	0.767	0.382

Los datos presentados son el promedio ± desviación estándar.

Biomarcadores enzimáticos

El análisis estadístico reveló diferencias en los valores de actividad hepática de CE. Los peces expuestos a diésel (D) correspondientes a las dietas 100HP, 97HP:3AP, 97HP:3BB y 94HP:6BB presentaron valores de actividad CE significativamente más altos (p <0.05) en comparación con los peces del grupo control (A) de la misma dieta. Sin embargo, esta diferencia no se observó entre los peces alimentados con la dieta 94HP:6AP, donde ambos grupos (A y D) mostraron valores similares (Fig. 2). Los valores de actividad CE de peces sin exposición a diésel fueron ligeramente mayores en las dietas 94HP:6AP y 94HP:6BB.

La actividad GST tuvo valores similares entre dietas en los peces sin exposición a diésel. En los peces con exposición a diésel la actividad de GST, correspondientes a las dietas 100HP, 97HP:3AP y 94HP:6AP presentaron valores de actividad GST significativamente mayores (p <0.05) con respecto a los peces sin exposición al hidrocarburo de la misma dieta, mientras que al comparar entre tratamientos (A y D) correspondientes a las dietas 97HP:3BB y 94HP:6BB no se presentaron diferencias estadísticas de actividad GST (Fig. 3).

La actividad de la ALP fue significativamente mayor (p <0.05) en los peces expuestos a diésel y en los alimentados con la dieta 97HP:3AP (Fig. 4). En los peces sin exposición a diésel, la actividad ALP fue mayor en la dieta 100HP (p <0.05).

DISCUSIÓN

Parámetros de crecimiento y desempeño dietario

Al final del periodo de alimentación, no se encontraron diferencias significativas (p< 0.05) en los parámetros de crecimiento evaluados en los peces que consumieron las diferentes dietas experimentales. Sin embargo, se pudo observar una pequeña mejora en peso final, GP y

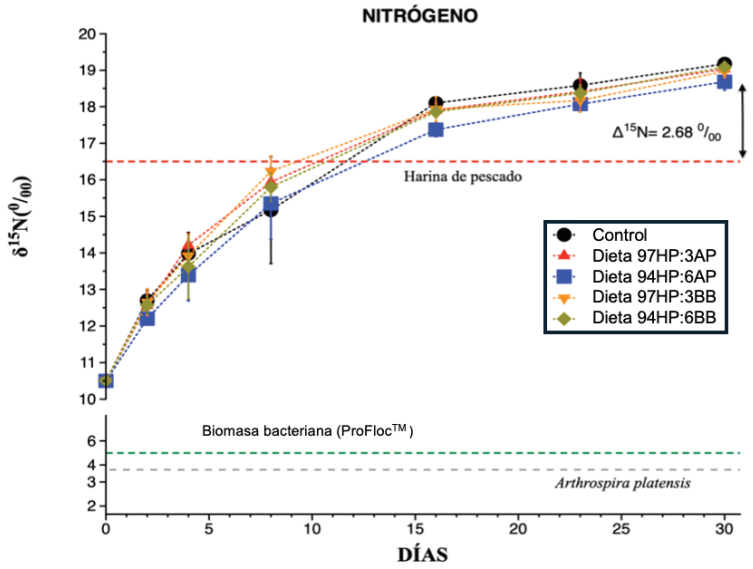

Figura 1. Cambios en los valores isotópicos de nitrógeno (‰) determinados en tejido muscular de tilapias alimentadas con dietas experimentales formuladas con harina de pescado (HP) y adicionadas con *Arthospira platensis* (AP) y biomasa bacteriana (BB). Las líneas de tendencia exponencial representan el cambio isotópico en músculo en los diferentes días de muestreo y las líneas punteadas horizontales representan los valores isotópicos de los ingredientes experimentales.

Tabla 4. Tasas de crecimiento (*k*), tasas estimadas de recambio metabólico (*m*) y tiempo medio de residencia (t_{50}) del nitrógeno en tejido muscular de tilapia (*Oreochromis niloticus*) alimentadas con diferentes dietas formuladas con harina de pescado (HP), *Arthospira platensis* (AP) y biomasa bacteriana, ProFlocTM (BB).

Tratamiento	*k* (d^{-1})	*m* (d^{-1})*	*k* vs *m* (%)	t_{50} (d)	r^2
Control	0.1029± 0.006	0.017	86-14	5.7	95
97HP:3AP	0.1038± 0.003	0.037	74-26	4.9	98
94HP:6AP	0.1029± 0.008	0.019	84-16	5.6	97
97HP:3BB	0.1039± 0.003	0.023	82-18	5.4	98
94HP:6BB	0.1028± 0.006	0.021	83-17	5.5	98

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

TC en los organismos alimentados con las dietas que contenían 3% en comparación al 6% de las fuentes microbianas. Lo anterior es consistente con lo reportado por Plaza *et al*. (2018), quienes al incluir 1% de *A. plantensis* a la dieta de tilapia del Nilo no observaron diferencias en la GP ni TCA. Por otro lado, estudios realizados con Lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) donde utilizaron tres tipos de proteínas unicelulares (bacterias, levaduras y algas), con niveles de inclusión de 12, 15 y 18%, se observó que niveles con menor inclusión mejoraban los parámetros de rendimiento, aunque no de manera significativa (Vasilaki *et al*., 2023). Por su parte, Gamboa-Delgado *et al*. (2020) utilizaron una biomasa de *Arthrospira* y harina bacteriana (ProFloc™) a una inclusión de 4% en alimento para camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en donde no se encontraron diferencias significativas al ser comparadas con las dietas control. Según Gamboa-Delgado & Márquez-Reyes (2018), el buen perfil nutricional de ambas fuentes microbianas, comparables al de la harina de pescado, podría explicar por qué las inclusiones de 3 a 6% no comprometen los parámetros de rendimiento, tanto en este estudio como investigaciones anteriores.

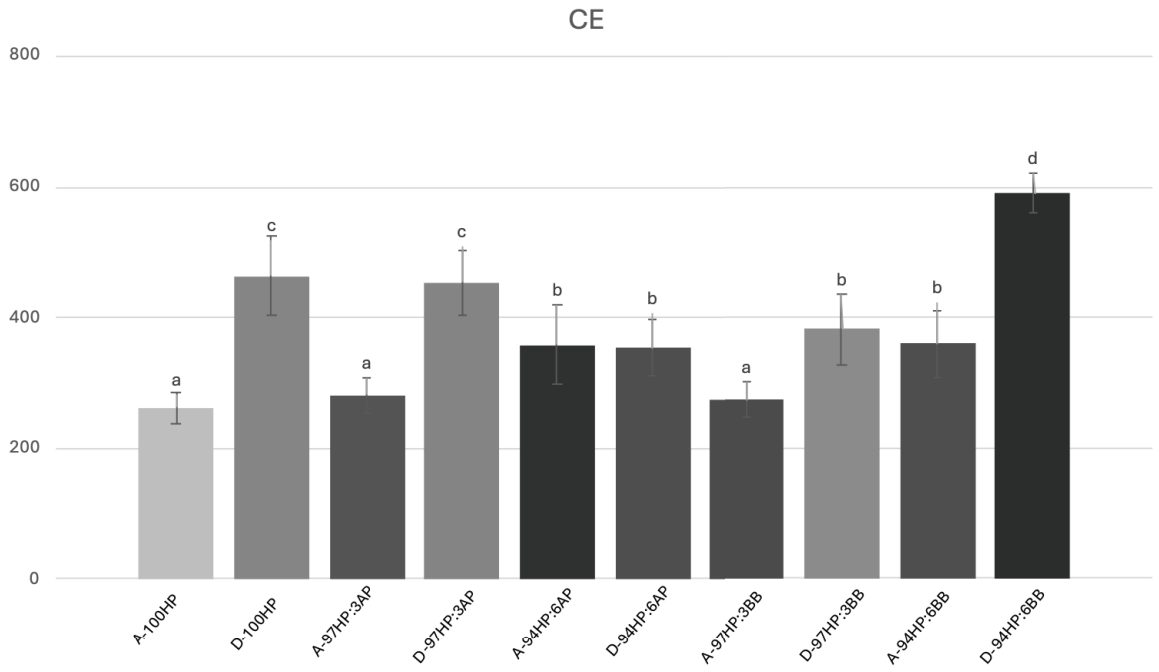

Figura 2. Actividad enzimática Carboxilesterasa (CE) determinada en hígado de tilapias del Nilo *O. niloticus* alimentadas con las diferentes dietas experimentales por 28 días y expuestas a una aplicación de diésel (D) y aceite (A). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

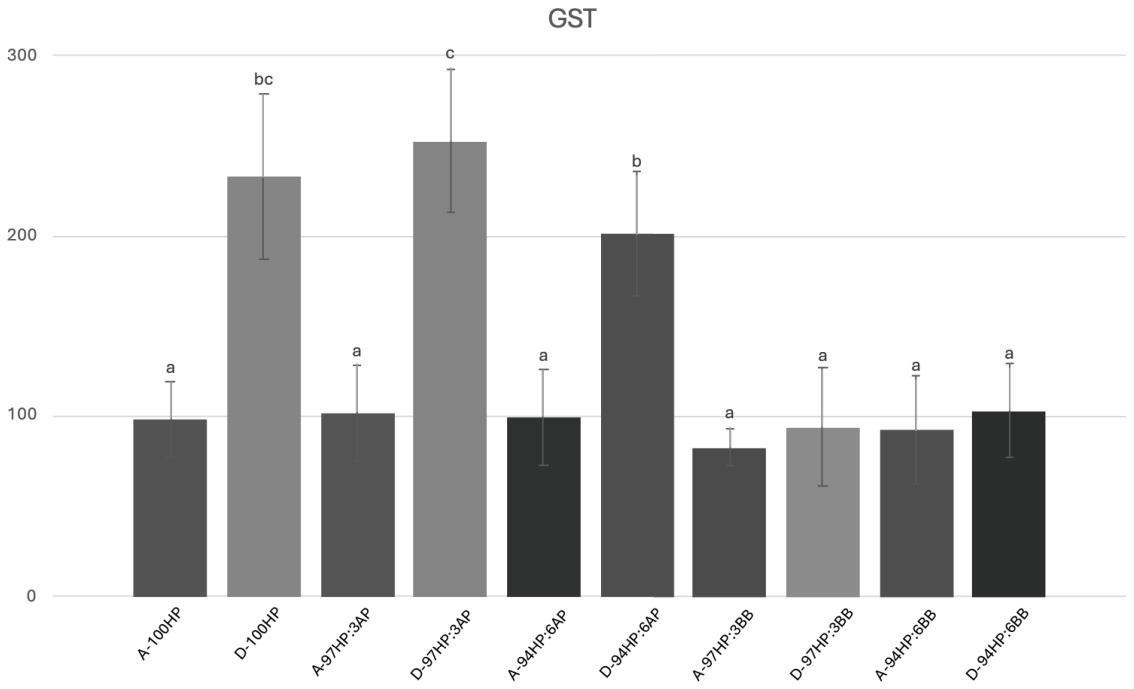

Figura 3. Actividad enzimática de Glutatión S-transferasa (GST) aislada del hígado de los peces *O. niloticus* alimentados con las diferentes dietas experimentales por 28 días y la posterior aplicación de diésel (D) y aceite (A). diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos con una comparación múltiple de medias Tukey (p <0.05)

Tabla 5. Proporciones relativas de nitrógeno dietario asimilado en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) sometida a diferentes tratamientos. Las proporciones de N en las dietas se consideran como proporciones esperadas y las obtenidas en tejido muscular se consideran las proporciones observadas. HP: harina de pescado, AP: *Arthrospira platensis*, BB: biomasa bacteriana.

Dieta	Composición de la dieta	Nitrógeno en la dieta (%)	Nitrógeno asimilado en músculo (%)
97HP:3AP	HP	97[a]	98.75 ± 0.46[a]
	AP	3	1.24 ± 0.46
94HP:6AP	HP	94[a]	95.86 ± 0.46[a]
	AP	6	4.14 ± 0.46
97HP:3BM	HP	97[a]	98.14 ± 0.47[a]
	BB	3	1.85 ± 0.47
94HP:6BM	HP	94[a]	99.15 ± 0.47[b]
	BB	6	0.85 ± 0.47

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

Estimación de la contribución nutrimental y tiempo de residencia del nitrógeno

El rápido crecimiento mostrado por los juveniles de esta especie de pez derivó en que los valores isotópicos de las dietas se reflejaran rápidamente en el tejido muscular. Los cambios isotópicos causados por los diferentes tratamientos siguieron una tendencia exponencial similar en el tiempo, la cual fue explicada por la influencia isotópica predominante del alto nivel de harina de pescado y a la baja inclusión de ingredientes aditivos experimentales en las cuatro dietas combinadas. La evaluación de las dinámicas isotópicas en ingredientes, dietas y tejido muscular permitió estimar la asimilación de los ingredientes experimentales e inferir acerca de dos parámetros metabólicos de los peces. En el primer caso, se estimó que, el crecimiento somático (y no la tasa de recambio metabólica) fue el principal promotor de cambio isotópico. En estudios previos sobre peces, se ha encontrado que las dietas restringidas en nutrientes provocan menor crecimiento, sin embargo, los cambios isotópicos continúan en los respectivos tejidos en virtud de las tasas de recambio metabólicas (mayor influencia de *m* que de *k*) (Ankjærø *et al.*, 2012; Conceição *et al.*, 2001). Una segunda inferencia en el presente estudio fue que el tiempo medio de residencia del nitrógeno en músculo se mantuvo en el rango de 4.9 a 5.7 días.

La dieta control, cuyo contenido era 100HP como fuente de proteína, promovió un t_{50} mayor al causado por el resto de los tratamientos. Esto se puede atribuir a que la harina de pescado presenta mayor digestibilidad y el perfil de aminoácidos es adecuado para la tilapia del Nilo, por lo tanto, promueve un rápido crecimiento.

Zhou & Gu (2020) aplicaron las mismas técnicas isotópicas en tilapias de similar talla y reportaron vidas medias más cortas para el nitrógeno, las cuales fueron causadas por una mayor duración del experimento (56 días), y al igual que en el presente estudio, tales valores fueron también fomentados por dietas que promovieron parámetros de crecimiento óptimos. El t_{50} observado en el presente estudio en los peces bajo el efecto de las dietas experimentales se puede deber a que existe una rápida ingestión, digestión, calidad proteica y asimilación de los nutrientes (Gamboa-Delgado *et al*., 2020). Tales valores fueron consistentes a los reportados por García-Pérez *et al*. (2022) en un estudio con juveniles de tilapia del Nilo alimentadas con dietas formuladas con harina de pescado y harina de insectos, las cuales causaron tiempos medios de residencia de 4.7 a 6.2 días.

En peces que se encuentran en condiciones que promueven un rápido crecimiento (*k*), el principal factor causante del cambio isotópico es la obtención de masa muscular (García-Pérez *et al*., 2022); en segundo término, se encuentran las tasas de recambio metabólico (*m*). En el presente estudio, no se detectaron diferencias significativas entre los valores *k* y *m*, sin embargo, la dieta que aportó 3% de *A. platensis* incrementó la tasa de recambio metabólica en músculo, lo cual pudo deberse a un efecto estimulante provocado por la biomasa de esta cianobacteria, lo cual no se observó bajo el efecto del resto de tratamientos. En el caso opuesto, cuando se obtienen valores *k* mucho mayores a *m*, se puede atribuir a una combinación de mayores tasas de crecimiento y una menor proporción de energía siendo utilizada por el metabolismo (Barreto-Curiel *et al*., 2018).

Aunque no se pudieron observar diferencias significativas entre los valores de discriminación entre tratamientos, se conoce que los cambios se deben a las diferentes vías metabólicas que siguen los componentes nutricionales y sus respectivos isótopos (Therrien *et al*., 2011). El factor de discriminación isotópica ha sido propuesto como un indicador que ayuda a conocer la calidad nutricional de las dietas, ya que menores valores se han asociado a mejor calidad/cantidad de proteína (Gamboa-Delgado & Le Vay, 2009; Barreto-Curiel *et al*., 2018). La literatura reporta que en la mayoría de los organismos el $\Delta^{15}N$ aumenta entre 2.5 – 3.5 ‰ a medida que va subiendo el nivel trófico (Therrien *et al*., 2011). También se conoce que factores como la baja digestibilidad, cantidad inadecuada de proteínas y aminoácidos de las dietas puede aumentar el factor de discriminación (Barreto-Curiel *et al*., 2018).

Al analizar los resultados de las contribuciones nutricionales al crecimiento de la tilapia del Nilo alimentada con las diferentes dietas experimentales, se observó que las proporciones de nutrientes disponibles en las dietas fueron similares. Esto permitió inferir que existió una transferencia equivalente de nitrógeno (aminoácidos y proteínas) provenientes de la dieta control (100HP) y los dos ingredientes aditivos (AP y BB). Sin embargo, en la dieta 94HP:6BB la cantidad asimilada de nitrógeno proveniente de la harina de pescado fue mayor (5% más) que la aportada por la BB.

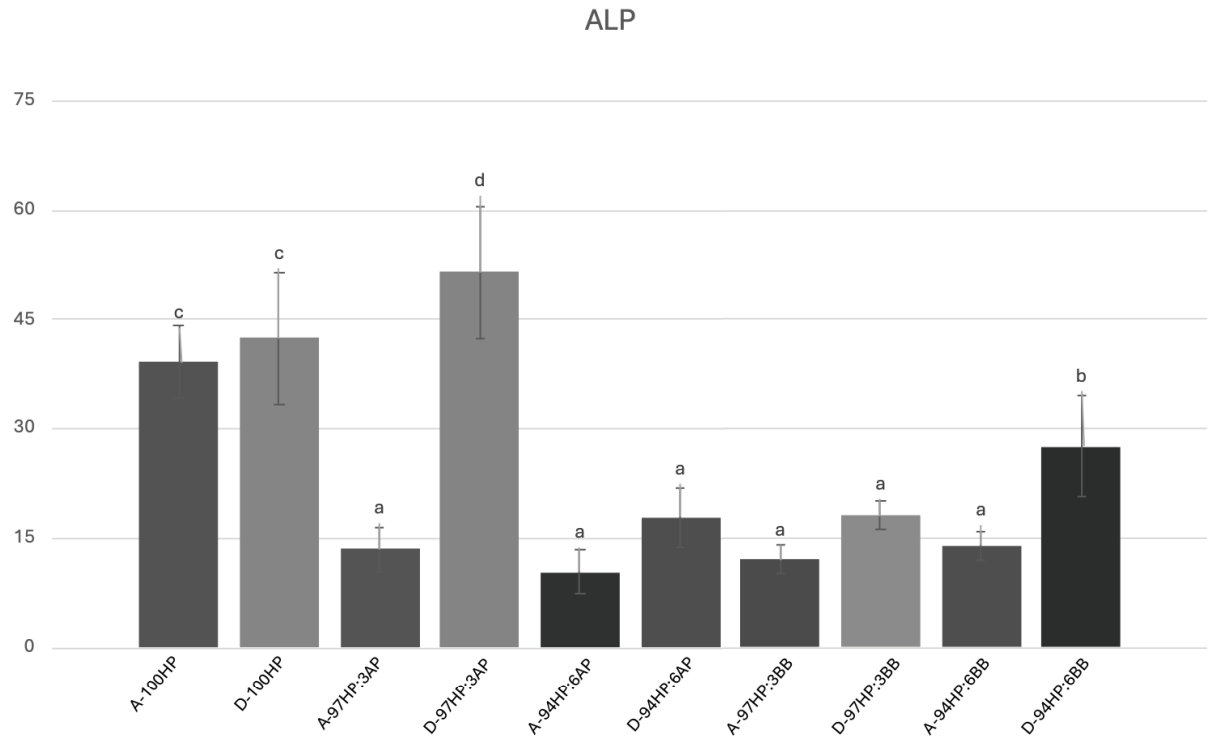

Figura 4. Actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina (ALP) aislada del hígado de los peces *O. niloticus* alimentados con las diferentes dietas experimentales por 28 días y la posterior aplicación de diésel (D) y aceite (A). diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos con una comparación múltiple de medias Tukey (p <0.05)

Investigaciones anteriores han reportado que en dietas para trucha arco iris a base de espirulina se necesita suplementar metionina y lisina (Teimouri *et al*., 2013), mientras que al incorporar una biomasa bacteriana existen hallazgos que demuestran una reducción del crecimiento en peces que reciben mayores proporciones de esta fuente debido a problemas en la palatabilidad, disminución de la absorción de N y aumento de la excreción de urea debido al alto contenido de nucleótidos en la BB (Gamboa-Delgado & Márquez-Reyes, 2018). En el presente estudio se pudo observar que la dieta 94HP:6AP promovió una mejor proporción de nitrógeno microbiano siendo incorporado en músculo. También se observó que la inclusión con 6% AP generó un menor factor de discriminación entre las dietas y los peces, siendo que la AP contiene alrededor del 47% de aminoácidos del peso total de la proteína (Soni *et al*., 2017). En un estudio sobre alimentación en camarón (*L. vannamei*), Gamboa-Delgado *et al.* (2017) utilizaron una dietaformulada con harina de pescado y harina de agregados bacterianos (50:50) derivados de un cultivo de tilapia. Al final del estudio, se observó que, en el tejido muscular de camarones, el 59% de los nutrientes provenía de la harina de pescado y el 41% de los agregados bacterianos.

Biomarcadores enzimáticos

Los resultados del presente estudio indican que la exposición a xenobióticos como los hidrocarburos a una dosis no letal, incrementan la actividad de las enzimas hepáticas CE, GST y ALP, lo que concuerda con lo observado en los estudios de Nogueira *et al*. (2013) y Aguilera-González *et al.* (2015). Según Allocati *et al*. (2018) y García-Pérez *et al*. (2020) estas enzimas están directamente relacionadas con la biotransformación, y la eliminación de sustancias nocivas para la célula. Sin embargo, los organismos alimentados con la dieta 94HP:6AP expuestos a diésel, no presentaron incrementos significativos en la actividad de la CE y ALP. Esto puede estar relacionado con el contenido de espirulina en la dieta, la cual contiene carotenoides y fitopigmentos (ficobilinas, xantófilas y ficocianinas) que actúan como sustancias antioxidantes naturales, disminuyendo el efecto oxidativo y el daño hepático (Mabrouk *et al*., 2022).

En la actividad de la GST, se pudo observar una reducción significativa en la expresión enzimática de los peces expuestos a diésel y alimentados con una menor cantidad de espirulina (252 VS 201 µmol/min/mg proteina; 97HP:3AP y 94HP:6AP respectivamente). En lo que respecta a los peces expuestos a diésel alimentados con biomasa bacteriana, se encontró una disminución significativa en la actividad de ALP y GST en comparación a los organismos expuestos a diésel y alimentados con la dieta control (100HP). Esto podría deberse al contenido de ectonia, una proteína unicelular con efecto osmoprotector y antioxidante, aminorando de esta forma el efecto oxidativo provocado por la presencia de xenobioticos (Matassa *et al*., 2016).

Los resultados encontrados en el presente estudio indican que la suplementación con AP y BB no afecta de manera negativa en los parámetros de rendimiento. Además, ambos ingredientes de origen microbiano influyeron positivamente al promover mejores tasas de crecimiento, así como altas tasas de recambio metabólico, dando como resultado menores tiempos medios de residencia de nitrógeno al comparar con el tratamiento control. En lo que respecta a la actividad de biomarcadores enzimáticos, los resultados indican que la adición de los ingredientes alternativos puede proteger al organismo debido a su interacción antioxidante, sin embargo, se sugiere realizar estudios adicionales que permitan confirmar este hecho.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecer el financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo y Fortalecimiento a la Investigación (PAFI) 2023 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL

REFERENCIAS

Abdel-Tawwab, M. & H. M. Ahmad. 2009. Live Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 40 (9): 1037-1046.

Aguilera-González, C., J. Cruz & R. M. Alfaro. 2015. Physiological response of alligator gar juveniles (*Atractosteus spatula*) exposed to sub-lethal doses of pollutants. *Fish physiology and biochemistry* 41: 1015-1027.

Al-Ghais, S. M., S. Ahmad & B. Ali. 2000. Differential inhibition of xenobiotic-metabolizing carboxylesterases by organotins in marine fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46 (3): 258-264.

Alemayehu, T., A. Geremew & A. Getahun. 2018. The Role of Functional Feed Additives in Tilapia Nutrition. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 9: 1-6.

Allocati, N., M. Masulli, D. di Ilio & L. Federici. 2018. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis* 7 (1): 8.

Alves, D. R. S., S. R. de Oliveira, T. G. Luczinski, W. R. Boscolo, F. Bittencourt, A. Signor & D. T. Detsch. 2020. Attractability and palatability of liquid protein hydrolysates for Nile tilapia juveniles. *Aquaculture Research* 51 (4): 1681-1688.

Ankjærø, T., J. T Christensen & P. Grønkjær. 2012. Tissue-specific turnover rates and trophic enrichment of stable N and C isotopes in juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* fed three different diets. *Marine Ecology Progress Series* 461: 197-209.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2006. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Ed. Association of Analytical Chemistry, Mary Land, USA.

Arriaga-Hernández, D., C. Hernández, E. Martínez-Montaño, L. Ibarra-Castro, L. Lizárraga-Velázquez, N. Leyva-López & M. C. Chávez-Sánchez. 2021. Fish meal replacement by soybean products in aquaculture feeds for white snook, *Centropomus viridis*: Effect on growth, diet digestibility, and digestive capacity. *Aquaculture* 530: 735823.

Barreto-Curiel, F., U. Focken, L. R. D'Abramo, J. A. Cuarón & M. T. Viana. 2018. Use of isotopic enrichment to assess the relationship among dietary protein levels, growth and nitrogen retention in juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 495: 794-802.

Barriga-Vallejo, C., C. Aguilera, J. Cruz, J. Banda-Leal, D. Lazcano & R. Mendoza. 2017. Ecotoxicological biomarkers in multiple tissues of the neotenic *Ambystoma spp*. for a non-lethal monitoring of contaminant exposure in wildlife and captive populations. *Water, Air, & Soil Pollution* 228: 1-11.

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.

Conceição, L. E. C., J. Skjermo, G. Skjåk-Bræk & J. A. J. Verreth. 2001. Effect of an immunostimulating alginate on protein turnover of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 24 (3): 207-212.

Darwish, R., M. A. Gedi, P. Akepach, H. Assaye, A. S. Zaky & D. A. Gray. 2020. *Chlamydomonas reinhardtii* is a potential food supplement with the capacity to outperform Chlorella and Spirulina. *Applied Sciences* 10(19): 6736.

Diniz, A. F. A., B. F. de Oliveira Claudino, D. M. C. Francelino, J. M. A. da Silva, B. C. Barros, R. R. A. Arruda, M. K. N. Melchiades, P. B. Ferreira, F. F. L. Júnior, L. S. Abreu, Y. M. do Nascimento, M. C. C. Silva J. F. Tavares & B. A. da Silva. 2024. *Arthrospira platensis* prevents contractile reactivity damage in obese rats fed a hypercaloric diet by positive modulating the Rho-A/Rho-kinase pathway, inflammation and oxidative stress. *Journal of Functional Foods* 115: 106116.

FAO. 2022. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, Disponible en línea en: DOI: 10.4060/cc0461es (consultado el 19 agosto 2024)

Gamboa-Delgado, J. & L. Le Vay. 2009. Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture* 291 (1-2): 115-123.

Gamboa-Delgado, J., A. G. A. Ibarra, Y. I. Morales-Navarro, M. G. Nieto-López, D. Villarreal-Cavazos, M. Maldonado-Muñiz M. Tapia-Salazar, D. Ricque-Marie & L. E. Cruz-Suárez. 2017. La Biomasa Microbiana como Ingrediente en la Nutrición Acuícola. *Avances en Nutrición Acuícola*. Universidad Autónoma de Nuevo León, pp. 213-263.

Gamboa-Delgado, J., M. G. Nieto-López, M. Maldonado-Muñiz, D. Villarreal-Cavazos, M. Tapia-Salazar & L. E. Cruz-Suárez. 2020. Comparing the assimilation of dietary nitrogen supplied by animal-, plant- and microbial-derived ingredients in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: A stable isotope study. *Aquaculture reports* 17: 100294.

Gamboa-Delgado, J. 2022. Isotopic techniques in aquaculture nutrition: State of the art and future perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 14 (1): 456-476.

Gamboa-Delgado, J. & M. Márquez-Reyes. 2018. Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture* 10 (1): 224-246.

García-Pérez, O. D., J. C. Cruz-Valdez, C. Ramírez-Martínez, D. Villarreal-Cavazos & J. Gamboa-Delgado. 2018. Exploring the contribution of dietary protein from poultry by-product meal and fish meal to the growth of catfish *Ictalurus punctatus* by means of nitrogen stable isotopes. *Latin American Journal of Aquatic Research* 46 (1): 37-44.

García-Pérez, O. D., R. M. Sánchez-Casas, G. Moreno-Degollado, C. A. G. Munguia, D. Villarreal-Cavazos & J. Gamboa-Delgado. 2022. Substitution of fish meal with Madagascar cockroach (*Gromphadorhina portentosa*) meal in diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects on growth, nutrient assimilation, and nitrogen turnover rates. *Fish Physiology and Biochemistry* 48 (6): 1587-1597.

García-Pérez, O. D., M. Tapia-Salazar, M. G. Nieto-López, J. C. Cruz-Valdez, M. Maldonado-Muñiz, M. Guerrero Guerrero, L. M. López & A. G. Marroquín-Cardona. 2020. Effects of conjugated linoleic acid and curcumin on growth performance and oxidative stress enzymes in juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feed with aflatoxins. *Aquaculture Research* 51 (3): 1051-1060.

Glencross B., S. Irvin, S. Arnold, D. Blyth, N. Bourne & N. Preston. 2014. Effective use of microbial biomass products to facilitate the complete replacement of fishery resources in diets for the black tiger shrimp. *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 431: 12–19.

Hesslein, R. H., K. A. Hallard & P. Ramlal. 1993. Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by 33S, 613C, and 615N. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50 (10): 2071-2076.

Jabir, M. A. R., S. A. R. Jabir & S. Vikineswary. 2012. Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of Biotechnology* 11 (24): 6592-6598.

Kirimi, J. G., L. M. Musalia, A. Magana & J. M. Munguti. 2016. Performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing blood meal as a replacement of fish meal. *Journal of Agricltural Science* 8: 79.

Mabrouk, M. M., M. Ashour, A. Labena, M. A. A. Zaki, A. F. Abdelhamid, M. S. Gewaily, M. A. O. Dawood, K. M. Abualnaja & H. F. Ayoub. 2022. Nanoparticles of Arthrospira platensis improves growth, antioxidative and immunological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to Aeromonas hydrophila. *Aquaculture Research* 53 (1): 125-135.

MacAvoy, S. E., S. A. Macko & L. S. Arneson. 2005. Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Canadian Journal of Zoology* 83 (5): 631-641.

Macias-Sancho, J., L. H. Poersch, W. Bauer, L. A. Romano, W. Wasielesky & M. B. Tesser. 2014. Fishmeal substitution with Arthrospira (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture* 426: 120-125.

Matassa, S., N. Boon, I. Pikaar & W. Verstraete. 2016. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microbial biotechnology* 9 (5): 568-575.

Mazorra, M. T., J. A. Rubio & J. Blasco. 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 131 (2): 241-249.

Munguti, J., M. Nairuti, R. Iteba, J. O. Obiero, K. O. Kyule, D. M. A. Opiyo & E. O. Ogello. 2022. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) culture in Kenya: Emerging production technologies and socio-economic impacts on local livelihoods. *Aquaculture, Fish and Fisheries* 2 (4): 265-276.

Nandurkar, H. 2017. Change in Alkaline Phosphatase Activity Induced by Tetracycline in Freshwater Mussel, Parreysia cylindrica (Annandale

and Prashad). *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 12: 92-94.

Napierska, D., J. Kopecka, M. Podolska & J. Pempkowiak. 2006. Hepatic glutathione S-transferase activity in flounder collected from contaminated and reference sites along the Polish coast. *Ecotoxicology and environmental safety* 65 (3): 355-363.

Nogueira, L., D. G. H. da Silva, T. Y. K. Oliveira, J. M. C. da Rosa, A. A. Felicio & E. A. de Almeida. 2013. Biochemical responses in armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere* 93 (2): 311-319.

Pakravan, S., A. Akbarzadeh, M. M. Sajjadi, A. Hajimoradloo & F. Noori. 2017. Partial and total replacement of fish meal by marine microalga *Spirulina platensis* in the diet of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Growth, digestive enzyme activities, fatty acid composition and responses to ammonia and hypoxia stress. *Aquaculture Research* 48 (11): 5576-5586.

Park, J. C., A. Hagiwara, H. G. Park & J. S. Lee. 2020. The glutathione S-transferase genes in marine rotifers and copepods: Identification of GSTs and applications for ecotoxicological studies. *Marine Pollution Bulletin* 156: 111080.

Phillips, D. L. & J. W. Gregg. 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* 127: 171-179.

Plaza, I., J. L. García & M. Villarroel. 2018. Effect of spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and stress responsiveness under hypoxia. *Spanish Journal of Agricultural Research* 16 (1): 7.

Romarheim O. H., M. Øverland, L. T. Mydland, A. Skrede & T. Landsverk. 2011. Bacteria grown on natural gas prevents soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon. *Journal of Nutrition* 141: 124–130.

Soni, R. A., K. Sudhakar & R. S. Rana. 2017. Spirulina–From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 69: 157-171.

Teimouri M., A. K. Amirkolaie & S. Yeganeh. 2013. The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 396–399: 14–19.

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

Vasilaki, A., E. Mente, E. Fountoulaki, M. Henry, C. Nikoloudaki, P. Berillis & I. Nengas. 2023. Fishmeal, plant protein, and fish oil substitution with single-cell ingredients in organic feeds for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Frontiers in Physiology* 14: 1199497.

Winter, E. R., E. T. Nolan, G. M. Busst & J. R. Britton. 2019. Estimating stable isotope turnover rates of epidermal mucus and dorsal muscle for an omnivorous fish using a diet-switch experiment. *Hydrobiologia* 828 (1): 245-258.

Xu, B., Y. Liu, K. Chen, L. Wang, G. Sagada, A. F. Tegomo & Q. Shao. 2021. Evaluation of methanotroph (*Methylococcus capsulatus*, Bath) bacteria meal (FeedKind®) as an alternative protein source for juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Frontiers in Marine Science* 8: 778301.

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