

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Contribución del biofloc inoculado con diferentes probióticos
sobre el crecimiento y niveles de actividad enzimática
digestiva en juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus* Var
SPRING)**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Vladimir Nicolás Muñoz Kuehne

Ensenada, Baja California, México

2018

Tesis defendida por

Vladimir Nicolás Muñoz Kuehne

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Codirector de tesis

Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza

Codirector de tesis

Dr. Gustavo Alejandro Rodríguez Montes de Oca

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Dr. Raúl Rangel Rojo



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Vladimir Nicolás Muñoz Kuehne © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Vladimir Nicolás Muñoz Kuehne** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Contribución del biofloc inoculado con diferentes probióticos sobre el crecimiento y niveles de actividad enzimática digestiva en juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus* Var SPRING)

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza

Codirector de tesis

Codirector de tesis

El presente estudio evaluó la actividad enzimática intestinal de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus* var SPRING) cultivada en tanques con tecnología biofloc (BFT) inoculados con probióticos comerciales. Cuatro tratamientos con biofloc, un control negativo y un control positivo se manejaron en tanques al aire libre de 310L: los tratamientos con BFT inoculado con el probiótico comercial Eco-aquablend® por cuatro (T1) y ocho semanas (T2). Así mismo, el probiótico comercial Eco-aquaprotect® se inoculó por cuatro (T3) y ocho semanas (T4), el control negativo uso agua limpia (C-) sin biofloc, con recambios de agua del 20% diario; el control positivo (C +) uso biofloc pero no se agregó probiótico. Todos los tanques fueron alimentados con 32% de proteína y 06% de lípidos. Cada tanque contenía 30 peces con un peso inicial de 11,66 g ± 2,43 g. La relación de alimentación se ajustó de 6 a 2% de la biomasa total, los peces fueron alimentados 2 veces al día. Se agregó harina de maíz y melaza en los tanques BFT para mantener una relación C: N la cual se fue modificando de 20: 1 a 10: 1 a lo largo del experimento. El sólido suspendido total (TSS) se mantuvo en alrededor de 50 mg l⁻¹ en tanques de BFT. Las enzimas leucina aminopeptidasa, quimotripsina, tripsina, proteasas alcalinas totales, fosfatasa y α-amilasa fueron evaluadas en intestinos de tilapia del Nilo utilizando sustratos específicos para cada enzima. Las tilapias criadas en BFT mostraron un mejor rendimiento de crecimiento. La supervivencia de los peces fue del 96%. La producción neta de biomasa fue un 43% más alta que en los tanques de control negativo, lo que confirma la utilización de biofloc por los peces como alimento. No hubo diferencia en el crecimiento / producción de peces entre T1, T2, T3 y C+. El crecimiento fue significativamente mayor para T4 (P <0.05). No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato entre los tratamientos. T4 mostró una mayor actividad en tripsina, quimotripsina, fosfatasa y α-amilasa; para las proteasas alcalinas totales, la mayor actividad fue para T1, T2 y T4, sin encontrar diferencias significativas entre estos tratamientos. El control negativo mostró la mejor actividad enzimática para Leucina. El uso del probiótico comercial (Eco-aquablend®) durante ocho semanas en un sistema BFT parece aumentar la producción de varias enzimas intestinales. Por lo tanto, la energía metabólica se usó de manera más eficiente para aumentar el crecimiento en la tilapia criada en BFT inoculada con este producto. Del mismo modo, se mejoró el costo-beneficio utilizando estos productos en el cultivo de biofloc de tilapia.

Palabras clave: Enzimas digestivas, biofloc, probióticos, *Oreochromis niloticus*

Abstract of the thesis presented by **Vladimir Nicolás Muñoz Kuehne** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Contribution of biofloc inoculated with different probiotics on the growth and levels of digestive enzymatic activity in juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* Var SPRING)

Abstract approved by:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza

Thesis Codirector

Thesis Codirector

The present study evaluated the intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in tanks with biofloc technology (BFT) inoculated with commercial probiotics. Four biofloc treatments, a negative and a positive control were managed in 310L outdoor tanks: BFT with a commercial probiotic (Eco-aquablend®) for four (T1) and eight weeks (T2); BFT with a commercial probiotic (Eco-aquaprotect®) for four (T3) and eight weeks (T4), and clean water negative control (C-) with no biofloc and water exchange of 20% daily; positive control (C+) with biofloc but no probiotic was added (Table 1). All tanks were fed with 32% crude protein and 06% lipids. Each tank contained 30 fish with an initial weight of 11.66 g ± 2.43g. Feeding ratio was adjusted from 6 to 2% of the total fish biomass daily in each tank. Cornmeal and molasses were added in BFT tanks to maintain a C:N ratio from 20:1 to 10:1. The total suspended solid (TSS) was maintained at around 50 mg l⁻¹ in BFT tanks. Leucine aminopeptidase, chymotrypsin, trypsin, total alkaline proteases, phosphatase and α-amylase enzymes were evaluated from intestines of Tilapia using specific substrates for each enzyme. Tilapias reared in BFT showed better growth performance. Fish survival was 96%. Net fish production was 43% higher in BFT tanks than in the negative control tanks confirming the utilization of biofloc by fish as food. There was no difference in fish growth/production among T1, T2, T3 and C+. Growth was significantly higher for T4 (P<0.05). No significant differences in ammonia, nitrite and nitrate were found among treatments. T4 showed higher activity in Trypsin, Chymotrypsin, Phosphatase and α-amylase; for total alkaline proteases, the higher activity were for T1, T2 and T4, with no differences among these treatments. Negative control showed the best enzymatic activity for Leucine. The use of the commercial probiotic (Eco-aquablend®) for eight weeks in BFT system seems to increase the production of several intestinal enzymes. Therefore, metabolic energy is used more efficiently to increase growth in tilapia reared in BFT inoculated with this product. Likewise, the cost-benefit was enhanced using these products on tilapia biofloc culture.

Keywords: Digestive enzymes, biofloc, probiotics, *Oreochromis niloticus*

Dedicatoria

A mis papás Nicola y Joaquín por haberme apoyado en todas mis decisiones, a mi yaya Rosa por su infinito amor, a mi tío Álvaro que en paz descanse, por su inspiración, a mis hermanos, Joaquín que en paz descanse, quien se extraña y está más presente ahora que nunca, a Bruno y Aldo por su amor y apoyo incondicional a pesar de la distancia.

A mí querida novia Daniella por haberme acompañado en esta y muchas otras aventuras con amor, apoyo, paciencia y motivación.

Agradecimientos

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para alcanzar esta meta.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, en especial al Departamento de Acuicultura por haberme aceptado en su programa de Maestría, por brindarme el apoyo para mis estudios y por haberme apoyado para realizar una estancia en Mazatlán y un viaje a Alemania para participar en ISWI 2017.

A la Facultad de Ciencias del Mar de la UAS por haberme facilitado espacios y material para desarrollar el experimento de esta tesis.

Al Dr. Juan Pablo Lazo Corvera, por aceptarme como su estudiante de maestría, por su apoyo incondicional en el proceso de este trabajo, por darme la oportunidad de crecer profesional y personalmente. Sin sus enseñanzas, sabiduría y profesionalismo nada de esto habría sido posible. Sobre todo, por su amistad. Gracias Dr.

Al Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza, por su inmensurable ayuda a lo largo de mi formación tanto de licenciatura como de maestría, por sus consejos, apoyo, paciencia, asesoría y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Gustavo Alejandro Rodríguez Montes de Oca, por todo el apoyo y facilidades que me otorgo durante la etapa experimental de la tesis, por todo el conocimiento brindado, por trabajar mano a mano conmigo y por su amistad.

Al Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero, por haberme ofrecido su ayuda, así como por sus comentarios, críticas constructivas, las cuales ayudaron a enriquecer este trabajo y por siempre estar disponible para apoyarme.

Al Dr. Raúl Rangel Rojo, por apoyo, críticas constructivas, sugerencias y amistad.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla, por haber sido un excelente profesor, por haberme apoyado y brindado consejo y amistad.

Al Dr. Emmanuel Martínez Montaña y Dra. María Isaura Bañuelos Vargas por haberme apoyado en las extracciones de tejidos en la FACIMAR, así como por su amistad y conocimiento brindados.

Al M en C. Honorio Cruz, por sus comentarios, sugerencias, por haberme apoyado durante la parte experimental, sin su ayuda este trabajo se hubiera prolongado de maneras incalculables y también por su amistad.

A la planta académica del Departamento de Acuicultura.

A la Dra. Beatriz Cordero por su paciencia y apoyo académico

A la M. en C. Paola Pérez Arvizu por su apoyo durante la parte experimental y por haberme brindado su amistad y conocimiento.

A mis compañeros de casa Luis Quinn y Daniela Yolanda por haberme apoyado con ideas, conocimiento, compañía y amistad.

A todos mis amigos con los que compartí ideas, alegrías, fiestas y ayudaron a hacer de mi estancia un periodo más llevadero.

A las secretarias Amparo Valverde y Dalila Mercado, por haberme ayudado con trámites académicos y haberme aportado su amistad.

Finalmente, a todas las personas que confiaron en mí y ayudaron en mi formación académica y personal.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Introducción general.....	1
1.2 Antecedentes.....	4
1.3 Justificación.....	7
1.4 Hipótesis.....	8
1.4.1 Objetivo general	8
1.4.2 Objetivos particulares.....	8
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Obtención de organismos.....	9
2.2 Infraestructura del área experimental.....	10
2.3 Diseño experimental.....	11
2.4 Inoculación de tanques.....	11
2.5 Inicio del experimento.....	14
2.6 Calidad de agua.....	15
2.7 Alimentación.....	15
2.8 Muestreo para enzimas.....	16

2.9	Parámetros biológicos.....	17
2.9.1	Peso promedio inicial.....	17
2.9.2	Peso promedio final.....	18
2.9.3	Factor de conversión alimenticia.....	18
2.9.4	Tasa de crecimiento específico (TCE %)... ..	19
2.9.5	Tasa de sobrevivencia (TS %)... ..	19
2.9.6	Tasa de eficiencia proteica (TEP)... ..	19
2.9.7	Índice hepatosomático (IHS)... ..	20
2.9.8	Ganancia en biomasa total.....	20
2.9.9	Ganancia en peso diario (GPD)... ..	20
2.9.10	Proteínas suministradas totales (PST)... ..	20
2.9.11	Hematocrito.....	21
2.10	Análisis enzimático.....	21
2.10.1	Cuantificación de proteínas solubles.....	22
2.10.2	Proteasas alcalinas totales.....	23
2.10.3	Leucina aminopeptidasa, quimotripsina y tripsina.....	24
2.10.4	Fosfatasa.....	24
2.10.5	α -amilasa.....	24
2.11	Análisis estadístico.....	25

Capítulo 3. Resultados

3.1	Calidad de agua.....	26
3.1.1	Amonio.....	26
3.1.2	Nitritos.....	27
3.1.3	Nitratos.....	28
3.1.4	Alcalinidad.....	29
3.1.5	pH.....	30
3.1.6	Flóculos.....	31

3.1.7	Temperatura.....	32
3.1.8	Oxígeno disuelto.....	33
3.1.9	Sólidos disueltos y conductividad.....	34
3.2	Parámetros biológicos.....	36
3.2.1	Crecimiento.....	36
3.2.2	Índices de eficiencia alimenticia.....	38
3.2.3	Supervivencia.....	39
3.2.4	Hematocrito.....	39
3.2.5	Índice hepatoesomático (IHS).....	39
3.3	Actividad enzimática.....	41
3.3.1	Proteasas alcalinas totales.....	41
3.3.2	tripsina.....	42
3.3.3	Quimotripsina.....	43
3.3.4	Leucina aminopeptidasa.....	44
3.3.5	Fosfatasa alcalina.....	45
3.3.6	α -amilasa.....	46

Capítulo 4. Discusión

4.1	Calidad de agua.....	47
4.1.1	Amonio, nitritos y nitratos.....	47
4.1.2	Alcalinidad y pH.....	50
4.1.3	Flóculos.....	50
4.1.4	Temperatura y oxígeno disuelto.....	51
4.2	Parámetros biológicos.....	52
4.2.1	Crecimiento.....	52
4.2.2	Índices de eficiencia alimenticia.....	54
4.2.3	Hematocrito (Hc).....	55
4.2.4	Índice hepatoesomático (IHS).....	56

4.3 Actividad enzimática.....	57
4.3.1 Proteasas alcalinas totales, tripsina y quimotripsina.....	58
4.3.2 Leucina aminopeptidasa.....	59
4.3.3 Fosfatasas alcalinas.....	61
4.3.4 α -amilasa.....	62
Capítulo 5. Conclusiones	
5.1 Conclusiones generales.....	64
5.2 Recomendaciones.....	65
Literatura citada.....	66
Anexos.....	75

Lista de figuras

Figura		Página
1	Sistema de aireación para transporte de tilapias.....	9
2	Transporte de tilapias en tanques aireados.....	9
3	Tanques de 450 L para cultivo de juveniles de tilapia distribuidos aleatoriamente.....	10
4	Sistema de aireación con manguera Aerotube® de ½ in conectado a un blower de 2.5 HP.....	10
5	Preparación de los nutrientes para mantenimiento de biofloc en los diferentes tratamientos.....	13
6	Activación de los probióticos en unidades de 1 L con aireación constante.....	14
7	Extracción de intestino y estomago de juvenil de tilapia del Nilo.....	16
8	Intestino de tilapia colocado desde la parte anterior (A) a la parte media (M).....	17
9	Análisis de hematocrito en una tabla de escalas para hematocrito.....	21
10	Curva patrón de Bradford.	22
11	Concentración promedio y desviación estándar de la concentración de amonio durante el periodo de cultivo.	27
12	Concentración promedio y desviación estándar de la concentración de nitrito durante el periodo de cultivo.	28
13	Concentración promedio y desviación estándar de la concentración de nitratos durante el periodo de cultivo.....	29
14	Concentración promedio y desviación estándar de la concentración de bicarbonato durante el periodo de cultivo	30
15	Valores promedio y desviación estándar de pH durante el periodo de cultivo.	31
16	Volumen promedio y desviación estándar de flóculos durante el periodo de cultivo...	32
17	Temperatura promedio y desviación estándar de flóculos durante el periodo de cultivo.....	33

18	Concentración promedio y desviación estándar del oxígeno disuelto durante el periodo de cultivo.	34
19	Concentración promedio y desviación estándar de los sólidos disueltos totales durante el periodo de cultivo	35
20	Conductividad promedio y desviación estándar del agua durante el periodo de cultivo.....	36
21	Crecimiento promedio y desviación estándar de las tilapias en el ciclo experimental..	38
22	Actividad específica de proteasas alcalinas totales en intestino de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc.....	41
23	Actividad específica de tripsina en intestino de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc.	42
24	Actividad específica de quimotripsina en intestino de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc.	43
25	Actividad específica de leucina aminopeptidasa en intestino de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc	44
26	Actividad específica de fosfatasas en intestino de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc	45
27	Actividad específica de α -Amilasa en intestino de tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc	46

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Esquema del diseño experimental con sus diferentes tratamientos.....	11
2	Descripción del contenido de enzimas, bacterias y levaduras de los dos probióticos usados para inocular los sistemas de biofloc con tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>	13
3	Preparación de la curva estándar de calibración para Bradford.....	23
4	Promedio y desviación estándar de los parámetros biológicos de los diferentes tratamientos con probióticos.....	40
5	Ingredientes y cantidades para la preparación del reactivo 1.....	75
6	Ingredientes y cantidades para la preparación del reactivo 2.....	75
7	Ingredientes y cantidades para la preparación del reactivo 3.....	76
8	Ingredientes y cantidades para la preparación del reactivo 4.....	76

Capítulo 1. Introducción

1.1. Introducción general

La industria acuícola ha crecido rápidamente desde la década de los 70's, a un ritmo aproximado del 9% por año. La producción acuícola mundial de pescado representó el 44.1% de la producción total de productos acuáticos en el 2016 (FAO, 2016). Este crecimiento ha generado polémica a la industria acuícola, ya que esta actividad ha contribuido a la degradación y contaminación ambiental. Por lo tanto, es de crucial importancia mejorar las prácticas y manejo de los cultivos, dándoles una dirección más ecológica. Entre los principales problemas de la actividad acuícola, se encuentran la alta dependencia en proteínas y lípidos provenientes de la harina y aceite de pescado (i.e., recursos no sustentables), los altos costos de terreno para producción y la falta de agua (Emerenciano et al. 2013). Actualmente los peces de origen dulceacuícola (i.e., carpas y tilapias) son el principal grupo de especies de la producción piscícola mundial (FAO, 2016).

En este contexto, la tilapia es el pez de agua dulce con mayor importancia comercial en México. En los últimos años esta especie se ha cultivado a lo largo de todo el país en diferentes cuerpos de agua, generando una amplia variedad de nichos económicos, llegando a representar más del 60% de la producción dulceacuícola nacional (Apun et al. 2009). La tilapia es una especie de zonas tropicales y subtropicales, es un pez omnívoro, lo que quiere decir que se alimenta tanto de fuentes vegetales como animales. Es resistente a enfermedades, variaciones de temperatura, oxígeno y concentraciones altas de compuestos nitrogenados (Tengjaroenkul et al. 2000; Apun et al. 2009; Pérez-fuentes et al. 2016). Debido a su alta resistencia, la tilapia se ha podido cultivar en agua de mar. Sin embargo, la forma cada vez más popular para la producción de esta especie es a través de la intensificación de su cultivo en sistemas de agua dulce.

Los sistemas intensivos acuícolas han demostrado ser eficientes en producción de altas densidades de biomasa de peces y crustáceos en espacios reducidos, sin embargo, las altas densidades pueden provocar problemas como la acumulación de desechos nitrogenados derivados del alimento y excreciones de los organismos cultivados, los cuales pueden llegar a ser tóxicos dependiendo de su tipo y concentración (Avnimelech, 2007). Los organismos que están siendo cultivados a altas densidades, necesitan la adición de altas cantidades de alimento, por lo que la calidad del agua se puede ver afectada directamente debido

a las altas concentraciones de materia orgánica en el sistema (Ekasari, et al. 2010). Avnimelech y Ritvo (2003) mencionan que solamente del 20% al 30% del alimento suministrado es asimilado por los peces, el resto se acumula en el sistema como materia orgánica (alimento no consumido y heces). Se sabe que el alimento representa el 50% o más del gasto de producción de un cultivo. Si se quiere alcanzar una acuicultura sustentable es necesario mejorar no solo la calidad del alimento, sino también las prácticas alimenticias. El alimento vivo o natural encontrado en las bio-películas y biofloculos ha demostrado proveer una gran parte de los requisitos nutricionales en un cultivo semi-intensivo de camarón (Mart et al. 2012). Así mismo, el uso de tecnologías biofloculantes o bioflocs (BFT), han demostrado reducir los impactos ambientales negativos generados por los organismos acuícolas al reutilizar el nitrógeno libre del agua (Crab, et al. 2007).

Los sistemas biofloculantes combinan la remoción de desechos nitrogenados y nutrientes con producción de biomasa microbiana, la cual puede servir como alimento para la tilapia (De Schryver, et al. 2008). Los nutrientes se convierten en biomasa microbiana que al llegar a un densidad adecuada puede ser consumida por los organismos cultivados reduciendo de esta manera el uso de alimentos formulados (Avnimelech, 2007; Ekasari, et al. 2010). Estos flóculos pueden llegar a alcanzar una corpulencia de hasta 1000 μm , siendo de un tamaño adecuado para que las tilapias en el cultivo puedan consumirlos. De acuerdo con De Schryver, et al. (2008), solo del 2 al 20% de la fracción orgánica de los flóculos están constituidos por células microbianas vivas, mientras que el total de materia orgánica puede ser entre 60 a 70% y la materia inorgánica del 30 al 40%. Debido a que la masa microbiana presenta una densidad de alrededor de 1.0 g de peso húmedo por mililitro de floc, estos tienden a sedimentarse lentamente, lo cual permite su fácil captura por los organismos en el cultivo.

Si el biofloc es utilizado como alimento en la acuicultura puede conllevar varios beneficios en los sistemas de producción ya que es un alimento que se encuentra disponible las 24 horas del día, lo que podría reducir sustancialmente los gastos por alimentación, que como ya se mencionó pueden llegar a ser hasta del 50% del costo total de producción. La calidad de agua mejora debido a la constante producción de biomasa bacteriana, la cual transforma el nitrógeno del sistema, manteniendo bajos los niveles de nitrógeno potencialmente dañino en el agua (Martínez-Córdova, et al. 2009).

Avnimelech (2007) menciona que para el desarrollo adecuado del biofloc se necesita la adición constante de una fuente de carbono como glucosa, sacarosa, melaza, glicerol o dextrosa para que las bacterias en el sistema puedan usarlo como sustrato energético para sus procesos metabólicos. Azim y Little (2008) proponen que incrementar la relación carbono: nitrógeno (C:N) promueve la conversión del nitrógeno

libre en biomasa bacteriana la cual está disponible para el consumo de los organismos del cultivo en el sistema. Una relación C:N > 10:1 se considera óptima para el crecimiento bacteriano, donde el nitrógeno es inmovilizado dentro de la célula bacteriana, mientras que los sustratos orgánicos (azúcar, celulosa o almidón) son metabolizados para producir energía y crecimiento (Avnimelech, 1999). Sin embargo, la carga microbiana dentro del sistema biofloc es muy dinámica. Los flóculos microbianos están compuestos de una mezcla heterogénea de microorganismo (formadores de floc y bacterias filamentosas), partículas, coloides, polímeros orgánicos, cationes y células muertas entre otras (Jorand, et al. 1995).

Dentro de los flóculos se pueden encontrar bacterias benéficas tales como *Bacillus* y *Lactobacillus* (Anand et al. 2014). Así mismo, se han encontrado veintidós tipos de clorofila y carotenoides dentro de un sistema de biofloc con camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Ju, et al. 2008). Estos organismos se conocen como probióticos los cuales ayudan a controlar y balancear los niveles de bacterias tanto benéficas como potencialmente patógenas dentro de la microbiota intestinal de los organismos. Se ha reportado que los probióticos “influyen positivamente en procesos como la digestión, inmunidad y resistencia a enfermedades” (Monroy Dosta, et al. 2012 en Hernández, 2014).

Además de ser alto en concentración de proteínas, ácidos grasos poliinsaturados y altamente insaturados (PUFA y HUFA) (Mart, et al. 2012), el biofloc es una fuente rica en promotores de crecimiento y compuestos bioactivos, así como vitaminas y aminoácidos esenciales (Ju et al. 2008), los cuales promueven la actividad de enzimas digestivas como proteasas y lipasas. Por su parte, Epp, et al. (2002) demostraron que los camarones podían utilizar los aminoácidos encontrados en el biofloc para la síntesis de proteínas, indicando que es posible sustituir en parte la harina de pescado en dietas para camarón. Así mismo las enzimas pueden ser utilizadas para promover los valores nutritivos del alimento para peces ya que aumentan su digestibilidad. De forma natural las enzimas pueden transformar compuestos complejos del alimento en nutrientes más simples y más asimilables. Los organismos poseen enzimas endógenas localizadas en el sistema digestivo y estas enzimas ayudan a romper moléculas orgánicas complejas como la celulosa, almidón o la proteína, en sustancias mucho más simples. Es por esto que la adición de enzimas en el alimento pueden mejorar su utilización (Soltan, 2009). Si las enzimas son agregadas al medio de cultivo estas pueden ayudar a mejorar la calidad de agua a través de la biodegradación de materia orgánica proveniente de las heces, alimento no consumido, células muertas, entre otros (Sesay, et al. 2006).

Es por esto, que en el presente trabajo se cultivó tilapia, *Oreochromis niloticus* (Var SPRING) en sistema tipo biofloc, el cual fue adicionado con dos probióticos comerciales (Eco-aquablend® y Eco-aquaprotect®) directamente al agua de los tanques. Posteriormente se evaluó el efecto combinado de estos probióticos

con el sistema tipo biofloc, en la actividad enzimática intestinal de las tilapias y se relacionó esta actividad con el crecimiento y factores de condición de las tilapias.

1.2. Antecedentes

Daniel y Nageswari (2017) hicieron una revisión de los trabajos relacionados al uso de probióticos exógenos en sistemas tipo biofloc y el impacto que estos tienen en el cultivo de animales acuáticos. Mencionan que recientemente se están usando probióticos aislados recientemente o la combinación de varios probióticos bien conocidos que puedan aportar beneficios a los organismos cultivados, tales como mejorar la sobrevivencia, aumentar el crecimiento, reducir la presencia de microorganismos patógenos, mantener la calidad de agua y en consecuencia, la reducción de costos de producción. Sin embargo, comentan que, debido a la poca información disponible, se ha vuelto de gran importancia desarrollar investigación sobre los efectos que tienen en conjunto los probióticos y biofloc sobre mejoramiento del crecimiento y la respuesta inmune de los animales cultivados.

La empresa Eco Technology Solutions maneja varios productos para el mejoramiento de sistemas acuícolas. Por lo que en el presente trabajo se seleccionaron dos probióticos comerciales (Eco-Aquaprotect® y Eco-Aquablend®) los cuales están diseñados para mejorar la calidad de agua y evitar la proliferación de organismos patógenos en los sistemas por:

- a) La competencia por recursos.
- b) La antibiosis inducida por producción de altas concentraciones de bacteriocinas.
- c) La inhibición de señalizadores de población (quorum-quenching).

Se ha observado que su administración oral tiene un efecto probiótico el cual ayuda a estimular el sistema inmune de la especie acuícola cultivada haciéndola más resistente al ataque de patógenos al colonizar el tracto digestivo. Incrementa el aprovechamiento del alimento balanceado por su alto contenido de enzimas y nutrientes. Apoya también en la disminución de compuestos nitrogenados de la columna de agua. Ayuda a eliminar el uso de los costosos antibióticos y químicos desinfectantes que son la causa de rechazo en algunos mercados logrando así un manejo más sustentable del cultivo.

Long et al. (2015) realizaron un experimento en tilapia del Nilo genéticamente mejorada (GIFT), en el cual evaluaron los efectos del biofloc sobre el crecimiento, actividad de las enzimas digestivas, parámetros

hematológicos y respuesta inmune por un periodo de 8 semanas. Los autores mantuvieron un valor de 15 para la relación C:N, la luz de las unidades experimentales fue controlada para impedir el crecimiento de microalgas, las cuales pudieran modificar los parámetros de calidad de agua y no llevaron a cabo recambios de agua más que en el grupo control. Como resultado encontraron que los niveles de nitritos y nitratos fueron menores en los sistemas con biofloc. La sobrevivencia fue del 100%, el uso de biofloc incremento la tasa de crecimiento específico y el rendimiento neto. Así mismo, el peso individual final, ganancia en peso y la tasa de eficiencia proteica fue mayor comparada al grupo control, mientras que la tasa de conversión alimenticia fue menor en los tratamientos con biofloc. En lo que a actividad enzimática corresponde, la actividad de amilasa intestinal y la de lipasas en el hígado, fueron mayores en los tratamientos con biofloc. Los valores de los parámetros hematológicos (conteo de glóbulos blancos, rojos y niveles de hematocrito y hemoglobina) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, la actividad del suero glutatiónina peroxidasa y lisozimas fue considerablemente mayor en los tratamientos con biofloc. Todos estos resultados demostraron que el cultivo de tilapia del Nilo en sistemas con biofloc, mejora el crecimiento, la actividad enzimática digestiva, la respuesta inmune de los peces y mantiene los parámetros de calidad de agua dentro de los rangos aceptables para el cultivo de esta especie.

Por su parte, Luo et al. (2014) evaluaron el crecimiento, actividad de las enzimas digestivas, bienestar (actividad enzimática T-SOD, LYZ y ALP) y viabilidad económica entre un sistema de recirculación de agua (RAS) contra un sistema tipo biofloc (BFT) cultivando tilapia genéticamente modificada (*Oreochromis niloticus* var SPRING). Los organismos fueron alimentados con una dieta comercial (Shanghai Nong Hao Special Feed Co., Ltd., Shanghai, China) la cual contenía 44% proteína cruda y 8.0% lípidos. En su trabajo concluyeron que los peces en cultivo BFT crecieron más rápido, obtuvieron sobrevivencias de 100% en ambos sistemas, aunque hubo presencia de $\text{NO}_2\text{-N}$ y TAN, las cuales pueden ser tóxicas dependiendo de su concentración así como por el pH y temperatura en el agua. Sin embargo, en este caso en ambos tipos de sistema se mantuvieron dentro de los niveles recomendados para el cultivo de esta especie. La concentración de proteína aportada por el biofloc cubrió los requisitos nutricionales de las tilapias, sin embargo, la concentración de lípidos crudos fue significativamente más baja en el biofloc que en el alimento formulado, lo cual indica que es necesaria la adición de alimento formulado con un porcentaje adecuado de lípidos para esta especie. La actividad enzimática de lipasas fue menor en el sistema BFT, y no se encontró diferencias significativas en la actividad de proteasas. Los niveles de T-SOD (Dismutasa superóxida total) fueron más altos en el sistema BFT, estas enzimas tienen un papel importante en la defensa contra los efectos tóxicos del oxígeno reactivo, lo cual indica que la inmunidad de las tilapias

cultivadas con biofloc aumenta. Así mismo, el costo-beneficio de producir tilapias en BFT fue mayor que en el cultivo usando RAS.

Mart et al. (2012) evaluaron la actividad de enzimas digestivas y parámetros de producción en camarón blanco (*L. vannamei*) cultivado en sistemas previamente inoculados con bacterias heterotróficas y autotróficas. La proliferación de microorganismos en estos sistemas fue controlada por medio de la adición de nitrógeno (fertilizante agrícola: N: P = 40 : 4), fuente de carbono (harina de trigo y melaza) y sustratos artificiales (malla plástica). No encontraron diferencias en la actividad enzimática de las lipasas, amilasas y tripsina entre el sistema control y el inoculado con bacterias autotróficas. Sin embargo, el sistema con bacterias heterotróficas presentó una actividad de tripsina y amilasa mayor, lo cual sugiere mayor actividad digestiva en los camarones derivada de la presencia de biofloc microbiano. La presencia de bio-película y biofloc producido por bacterias autótrofas y heterótrofas en conjunto de alimento formulado aumentaron el crecimiento y sobrevivencia de los camarones. Esto podría señalar que la combinación de alimento formulado con biomasa en forma de flóculos mejora la calidad del alimento suministrado a los camarones.

Monroy y colaboradores (2012) hacen una revisión de los trabajos realizados sobre los beneficios de usar probióticos bacterianos en organismos acuáticos. Como conclusión mencionan que el uso de probióticos “mejora el equilibrio ecológico de la flora intestinal, potenciando sus funciones benéficas y controlando sus posibles influencias perjudiciales”. También comentan que existe poca información acerca del uso de probióticos en sistemas intensivos acuícolas, siendo este un campo de gran potencial para futuras investigaciones.

Xu y Pan (2012) analizaron el efecto del biofloc con 0% recambios de agua en el rendimiento de crecimiento, aprovechamiento del alimento, actividad de las enzimas digestivas y composición corporal en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) durante 30 días utilizando dos niveles de C:N (15, 20) usando sacarosa como fuente de carbono, como grupo control usaron tanques con agua limpia, recambios de agua y sin adición de carbohidratos. Observaron sobrevivencias mayores al 90% en todos los tratamientos, el crecimiento en términos de peso ganado, peso final y tasa de crecimiento específico fue mayor en los dos tratamientos con biofloc, mientras que la tasa de conversión alimenticia fue significativamente mayor en los controles. Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron dentro de los niveles recomendados para el desarrollo de esta especie. Así mismo, el incremento general en la actividad enzimática de proteasas y amilasas fue mayor en los tratamientos con biofloc aunque los niveles de actividad enzimática no se comportaron igual entre los diferentes tejidos (intestino, estómago y

glandula digestiva). Estos resultados demostraron que el biofloc puede incrementar el crecimiento y aprovechamiento del alimento debido a que promueve la digestibilidad de los nutrientes.

Azim y Little (2008) evaluaron el efecto de la técnica de biofloc (BFT) en cultivos de tilapia (*Oreochromis niloticus* var SPRING) con luz controlada (para evitar la proliferación descontrolada de microalgas, las cuales pudieran modificar los parámetros de calidad de agua). Llevaron a cabo dos tratamientos con biofloc en los cuales manejaron diferentes niveles de proteína en la dieta (24% y 35% de proteína en cada tratamiento) y un control negativo con 35% de proteína y sin biofloc. A todos los tratamientos se les alimento diariamente a ración del 1.5% de su biomasa total. Añadieron harina de trigo en los tratamientos con biofloc para mantener un nivel óptimo de producción heterotrófica. Observaron que la calidad nutricional del biofloc fue adecuada para tilapia, la tasa de sobrevivencia fue del 100% en ambos tratamientos. La producción neta de tilapia fue 45% mayor en los tanques con biofloc que en el tratamiento control, lo cual confirmó que los organismos utilizaron el biofloc como alimento. El crecimiento o producción de los peces en cultivo de biofloc alimentados con dietas a diferentes niveles de proteínas (24% y 35% de proteína) no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Se compararon indicadores de bienestar como condición de las aletas, histología de branquias, composición proximal, hematocrito y niveles de cortisol en la sangre entre el sistema biofloc y control, no se encontraron diferencias significativas, por lo que se concluyó que las tilapias del Nilo no se estresan con la presencia del biofloc.

1.3. Justificación

El uso de biofloc en sistemas intensivos acuícolas está creciendo rápidamente debido a que el biofloc aumenta la producción en biomasa y reduce gastos, lo cual ayudaría a producir más biomasa a menor costo. En la camaronicultura se emplea extensamente este tipo de técnica y se está expandiendo su uso a otras especies de importancia comercial como tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus* var SPRING). Sin embargo, no se ha explorado el uso de probióticos para el cultivo de esta especie en sistemas biofloc, los cuales podrían ayudar a aumentar la actividad enzimática y la utilización del alimento, mejorar la calidad del agua, reducir la incidencia de enfermedades y el uso de alimentos. Por su parte, si el biofloc es utilizado como alimento se podría minimizar la cantidad de proteína cruda en los alimentos formulados para ciertas especies y por lo tanto aumentar la rentabilidad de las unidades de producción. Por lo tanto en el actual trabajo de investigación se evaluaron diferentes cepas de probióticos sobre la composición del biofloc,

actividad de enzimas digestivas intestinales y parámetros de crecimiento en alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus* var SPRING) en sistemas intensivos tipo biofloc.

1.4. Hipótesis

La adición de los probióticos Eco-Aquaprotec® o Eco-Aquablend®, promoverá el crecimiento y mayor actividad de las enzimas digestivas en alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus* var SPRING) bajo condiciones de cultivo en sistema biofloc.

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de adicionar probióticos Eco-Aquaprotec® o Eco-Aquablend® sobre los parámetros de crecimiento, calidad del agua y los niveles de actividad de las enzimas digestivas en alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus* var SPRING) cultivadas en sistema biofloc durante un periodo de 8 semanas.

1.4.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de los probióticos en los parámetros de calidad de agua.
2. Evaluar el efecto del biofloc inoculado con diferentes productos de probióticos y enzimas sobre los parámetros de crecimiento en alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus* var SPRING).
3. Evaluar el efecto del biofloc inoculado con diferentes productos de probióticos y enzimas sobre los niveles de actividad de proteasas alcalinas totales, α -amilasa, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus* var SPRING).
4. Evaluar el efecto del biofloc inoculado con diferentes productos de probióticos y enzimas sobre la composición y estabilidad de la relación C:N del cultivo con alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus* var SPRING).

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de organismos

Un total de 2000 juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus* var SPRING), con un peso promedio de $11.66 \text{ g} \pm 2.43$, fueron donados por la empresa GeneTilapia S.A. de C.V. Los organismos se trasladaron en contenedores enriquecidos con oxígeno (Figura 1 y 2) a las instalaciones del laboratorio de reproducción y cultivo de peces de la Facultad de Ciencias del Mar (FACIMAR), de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) en Mazatlán, Sinaloa. Estos organismos permanecieron por un día en un sistema de pre-engorda de 9 m^3 , el cual contaba con aireación constante. Los organismos no fueron alimentados a la llegada para poder extraer el intestino y estomago para su posterior análisis enzimático.



Figura 1. Sistema de aireación para transporte de tilapias.



Figura 2. Transporte de tilapias en tanques aireados.

2.2. Infraestructura del área experimental

El área de trabajo contó con 18 tanques marca Rotoplas® de 450 L (Figura 3). Para evitar derrames y escape de los organismos, estos tanques se llenaron a un volumen de 350 L. La aireación fue introducida a los tanques por medio de aireadores circulares de manguera tipo Aerotube® (Figura 4) de ½ in (1.25 cm de diámetro), los cuales fueron conectados a un blower de 2.5 HP. Todas las unidades experimentales se acomodaron aleatoriamente. Se utilizaron 3 réplicas por tratamiento por lo tanto se dispusieron 18 tanques llenados a 350 L.



Figura 3. Tanques de 450 L para cultivo de juveniles de tilapia distribuidos aleatoriamente.



Figura 4. Sistema de aireación con manguera Aerotube® de ½ in conectado a un blower de 2.5 HP.

2.3. Diseño experimental

El experimento fue diseñado por bloques al azar y consto de seis tratamientos con tres replicas cada uno: el primer tratamiento fue el control negativo (C-), a este no se le agrego biofloc y es el único tratamiento al cual se le realizaron recambios de agua diarios del 20%. El segundo tratamiento fue el control positivo (C+) este estaba integrado de biofloc sin adición de probióticos. El tercer tratamiento (T1) fue adicionado con biofloc y el probiótico Eco-Aquaprotec®, añadido diariamente durante 4 semanas posteriores a la introducción de los organismos. Para el cuarto tratamiento experimental (T2) se adiciono el probiótico Eco- Aquaprotec® a los sistemas con biofloc, pero por un período de 8 semanas. El quinto tratamiento (T3) fue de la misma manera que el tratamiento T1, pero con la adición del probiótico Eco- Aquablend® por un período de 4 semanas. El sexto tratamiento (T4) consistió en la adición del probiótico Eco- Aquablend® por un período 8 semanas (Tabla 1).

Tabla 1. Esquema del diseño experimental con sus diferentes tratamientos.

Diseño experimental	
Tratamiento 1 (C-)	Control – (recambios diarios 20%)
Tratamiento 2 (C+)	Control + (biofloc sin probiótico)
Tratamiento 3 (T1)	Biofloc probiótico Eco-Aquaprotec® 4semanas
Tratamiento 4 (T2)	Biofloc probiótico Eco-Aquaprotec® 8 semanas
Tratamiento 5 (T3)	Biofloc probiótico Eco-Aquablend® 4 semanas
Tratamiento 6 (T4)	Biofloc probiótico Eco-Aquablend® 8 semanas

2.4. Inoculación de los tanques

El trabajo consistió en agregar dos probióticos comerciales (Eco-Aquablend® y Eco-Aquaprotec®) durante cuatro y ocho semanas para evaluar su efecto en el cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus* var SPRING). Los dos probióticos son producidos por la empresa eco Technology Solutions (<http://ecotechnology.com.mx/eco-aquablend/eco-aquaprotec>) El probiótico Eco-Aquablend®, es una potente mezcla de bacterias del género *Bacillus sp.*, enzimas, y cofactores, los cuales han sido

cuidadosamente seleccionados por su alta capacidad para digerir la materia orgánica soluble contenida en los sistemas acuícolas, la rapidez de su efecto se da principalmente por su alto contenido de enzimas como proteasas, amilasas y celulasas, las cuales rompen de manera inmediata los enlaces complejos de ciertas sustancias disueltas en el agua y sedimentos para que así las bacterias heterotróficas trabajen de manera más eficiente en la biorremediación. Mientras que el probiótico Eco-Aquaprotec® es un producto basado en esporas de *Bacillus sp.*, *Brevibacillus laterosporus* y cofactores que ayudan en la inhibición de la proliferación de otras bacterias perjudiciales como el *Vibrio sp.*

Para la fertilización de todos los tanques se añadió 0.465 g de urea (5 mg/L) y 0.31 g de ácido fosfórico (0.6 mg/L). Con la diferencia que al resto de los tratamientos y al control positivo se les agregó 6.2 g de salvado de trigo (20 mg/L) y 7.75 g de alimento para peces con un 35% de proteína. Al tratamiento T1 y T2 se les añadió 1.55 g del probiótico comercial Eco-Aquaprotec® y 1.55 g (5 g/m³) de mezcla de nutrientes para su activación. Por último, a los tratamientos T3 y T4 se les añadió el probiótico comercial Eco-Aquablend®, igualmente a una concentración de 1.55 g (5 g/m³) más 1.55 g (5 g/m³) de su nutriente (tabla 2). Este proceso de fertilización se llevó a cabo los primeros 7 días del bioensayo. Al séptimo día, se redujo a la mitad la concentración de cada probiótico (i.e., de 1.55 g a 0.77 g (2.5 g/m³)) siguiendo las indicaciones del productor. Así mismo a los 14 días del bioensayo se redujo nuevamente a la mitad (i.e., de 0.77 g a 0.31 g (1 g/m³)) siguiendo las indicaciones del fabricante. En los tratamientos T1 y T3 se cesó el uso de probióticos a partir de la cuarta semana de experimento.

Para el mantenimiento de los flóculos se utilizó melaza y harina de maíz como fuente de carbono en una proporción de 1:1 (Figura 5) considerando un 80% de materia seca en la melaza. La ración alimenticia se fue ajustando semanalmente (de 8% en la semana uno, al 2% para la semana 8) a lo largo del experimento, en base a la biomasa aproximada obtenida por medio de biometrías semanales (n=10 peces por unidad experimental), registrando el peso individual (0.1 g) y la longitud estándar (0.1 cm) de cada pez. De igual manera la adición de las fuentes de carbono se ajustó semanalmente en base a la ración de alimento a suministrar.



Figura 5. Preparación de los nutrientes para mantenimiento de biofloc en los diferentes tratamientos.

Tabla 2. Descripción del contenido de enzimas, bacterias y levaduras de los dos probióticos usados para inocular los sistemas de biofloc con tilapia, *Oreochromis niloticus*.

	Eco-Aquablend®	Eco-Aquaprotec®
Enzimas	proteasa	proteasa
	amilasa	amilasa
	celulasa	celulasa
Bacterias	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus polymixa</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
	<i>Bacillus polymixa</i>	-
	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	-
Levaduras	<i>Thiobacillus novelus</i>	-
	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

*Nota: el nutriente utilizado (Nutrimax®) contiene azúcares simples (71%), aminoácidos libres (15%), péptidos y polipéptidos (7%), fósforo (2%), potasio (2%) vitaminas del complejo B (2%) y minerales (1%)

2.5. Inicio del experimento

Se utilizaron 90 tilapias por tratamiento con un peso promedio inicial de $11.66 \text{ g} \pm 2.43$ y se registró el peso inicial de todos los peces de cada tanque (i.e., 30 peces por tanque). Se estimó la biomasa total por tanque y se utilizó dicho valor para realizar los cálculos de la ración alimenticia y para el manejo de la relación C:N se utilizaron como fuentes de carbono harina de maíz y melaza con un 80% de materia seca en una proporción 1:1 (ajustado al 20% de humedad de la melaza) para una relación C:N inicial de 20:1 durante las dos primeras semanas de cultivo; posteriormente se redujo la relación C:N de 15:1 de la semana 3 a la semana 6 y finalmente se redujo a un valor de 10:1 para las semanas 7 y 8 del experimento.

Así mismo, para el procedimiento de incubación, se utilizaron botellas de 2 L en las cuales se agregaron las mezclas de los diferentes probióticos (T1, T2, T3 y T4) junto con melaza y harina de maíz. Para el caso del control positivo (C+) solo se adiciono harina de maíz y melaza. Estas botellas se dejaron madurar con agua de cada tanque por 24 horas con aireación constante dentro de un cuarto cerrado (figura 6). Posteriormente, las botellas fueron adicionadas a cada tanque. Este procedimiento se repitió cada día durante el periodo de experimentación (58 días).



Figura 6. Activación de los probióticos en unidades de 1 L con aireación constante.

2.6. Calidad de agua

Para el seguimiento de la calidad de agua de los tanques, se registró dos veces por semana el pH, temperatura (°C), sólidos disueltos totales (mg/L), conductividad (μs), utilizando un medidor multiparametro HANNA® HI 991300. El oxígeno disuelto (mg/L) se midió con un Oxímetro YSI® 550A, mientras que para el amonio (mg/L) y los nitratos (mg/L) se utilizó un multiparametro YSI® professional plus. Los nitritos (mg/L) y la alcalinidad (CaCO_3 mg/L) se cuantificaron utilizando un fotómetro YSI® 9300, una vez por semana. Los niveles de alcalinidad se ajustaron una vez por semana a 150 mg/l con carbonato de sodio grado industrial. Los flocs/ml se midieron dos veces por semana, utilizando conos de sedimentación Imhoff, en los cuales se colocó una muestra de un litro de biofloc y se dejó sedimentar por 30-45 minutos.

El control negativo (C-) recibió recambios de agua diarios del 5% de su volumen total, los tratamientos con biofloc y probióticos (C+, T1, T2, T3 y T4) recibieron recambios de agua del 5% el domingo de cada semana, esto con el fin de evitar la sobre acumulación de biofloc en el fondo y para recuperar volumen de agua perdido por la evaporación. Eventualmente, en algunos tanques se presentó una espuma naranja densa, en estos casos se procedió a hacer un recambio del 20% del volumen de agua total de los tanques (solo se presentaron dos casos).

2.7. Alimentación

Para llevar a cabo el experimento se utilizó una dieta comercial Nutripec-Purina® de 4.8 mm de diámetro, 32% de proteína y 6 % lípidos. Se calculó la biomasa de cada unidad experimental mediante la realización de biometrías semanales y se ajustó la ración de alimento en base al crecimiento de los organismos y de la cantidad de flocs por ml/L y la biomasa total por unidad. La ración de alimento por día se suministró en dos partes, la primera a las 8 am y la otra a las 2 pm. Los primeros dos días del bioensayo se dio una ración del 8% de la biomasa total (BT). Posteriormente se redujo la ración al 5% BT. A partir de la tercera semana se redujo la ración al 3% BT y al final de la sexta semana se volvió a reducir al 2% BT, hasta el final del experimento. Los domingos no se alimentó para que los organismos se acostumbraran a consumir biofloc.

2.8. Muestreo para enzimas

Al inicio del experimento, se tomaron 5 organismos del stock inicial. Estos peces fueron mantenidos en ayuno por 12 horas para eliminar el contenido estomacal del intestino y estómago. Se sacrificó a los organismos por medio de una punción en el cerebro. Posteriormente se abrieron los organismos con un corte desde el ano a la boca. Se colocaron los peces sobre charolas con gel-ice para evitar la degradación de las enzimas mientras se extraían los intestinos y estómagos (Figura 7). Una vez extraídos, los intestinos fueron colocados en forma de "S" en hojas de papel aluminio (Figura 8) y almacenados en hieleras con hielo seco y posteriormente en un ultra congelador a -80°C . De la misma forma, se almacenaron los estómagos en tubos Eppendorf y se colocaron dentro del ultra congelador a -80°C . La operación se repitió al finalizar la cuarta semana, tomando dos organismos por tanque (seis por tratamiento) y a las 8 semanas del experimento, con la diferencia que se tomaron cinco organismos por tanque (15 organismos por tratamiento) y los organismos fueron colocados en estanques de 50 L por 12 horas de ayuno para posteriormente extraer los intestinos y estómagos.



Figura 7. Extracción de intestino y estomago de juvenil de tilapia del Nilo.



Figura 8. Intestino de tilapia colocado desde la parte anterior (A) a la parte media (M).

2.9. Parámetros biológicos

Se tomó el peso promedio individual de los organismos de todas las unidades experimentales, mediante la realización de biometrías semanales. El resto de los indicadores se calcularon al concluir las 8 semanas del experimento.

2.9.1. Peso promedio inicial

El peso promedio inicial fue obtenido mediante la siguiente fórmula:

(1)

$$PI = \frac{BTI}{n}$$

Donde

PI= Peso promedio inicial

BTI= Biomasa total inicial

n= Número total de organismos

2.9.2. Peso promedio final

El peso promedio final fue obtenido mediante la siguiente fórmula:

(2)

$$Pf = \frac{BTF}{n}$$

Donde:

Pf= Peso promedio final

BTF= Biomasa total final

n= Número total de organismos

2.9.3. Factor de conversión alimenticia

Se obtuvo el FCA, por medio de la siguiente fórmula:

(3)

$$FCA = \frac{AC}{GPC}$$

Donde:

FCA= Factor de conversión alimenticia

AC= Alimento consumido (g)

GPC= Ganancia en peso corporal (g)

2.9.4. Tasa de crecimiento específico (TCE %)

La tasa de crecimiento específico se calculó utilizando la fórmula:

(4)

$$TCE (d^{-1}) = [(\ln (\text{peso final}) - \ln (\text{peso inicial}) / \text{días}] * 100$$

2.9.5.-Tasa de supervivencia (TS%)

Se determinó la tasa de supervivencia mediante la siguiente fórmula:

(5)

$$TS(\%) = \left(\frac{NPV}{NP} \right) X 100$$

Donde:

TS (%)= Tasa de supervivencia (%)

NPV= Numero de peces vivos al final del ciclo

NP= Numero de peces al inicio del ciclo

2.9.6. Tasa de eficiencia proteica (TEP)

La tasa de eficiencia proteica que se define como los gramos de peso ganado por gramo de proteína consumida, se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

(6)

$$TEP = \frac{Bf - Bi}{\text{Cantidad de proteína suministrada}}$$

Donde:

Bi= Biomasa inicial

Bf= Biomasa final

2.9.7. Índice hepatosomático (IHS)

Se determinó el índice hepatosomático mediante la siguiente fórmula:

$$IHS = \left(\frac{\text{Peso del hígado}}{\text{Peso total}} \right) \times 100$$

(7)

2.9.8. Ganancia en biomasa total

Se calculó la ganancia en biomasa total mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ganancia en biomasa} = \text{Biomasa final} - \text{Biomasa inicial}$$

(8)

2.9.9. Ganancia en peso diario (GPD)

Se calculó la ganancia en peso diario mediante la siguiente fórmula:

$$GPD = \frac{\text{peso promedio final} - \text{peso promedio inicial}}{\# \text{ días}}$$

(9)

2.9.10. Proteína suministrada total (PST)

Se determinó el total de proteína suministrada a lo largo del experimento mediante la siguiente fórmula:

$$PST = (\text{alimento consumido})(\% \text{ proteína en alimento})$$

(10)

2.9.11. Hematocrito

Al concluir el experimento, se recolectaron 5 peces por unidad experimental, los cuales se midieron y pesaron para posteriormente sacrificarlos por medio de sobredosis de anestesia. Se tomó una muestra de sangre de 0.5- 2.0 ml por punción en la vena o arteria caudal. Se utilizaron jeringas estériles desechables de 3 ml previamente heparinizadas (anticoagulante), una vez extraída la muestra de sangre, fue colocada en viales marca Eppendorf® de 1.5 ml. De los viales con la sangre se llenaron dos tubos capilares de cristal heparinizados de cada ejemplar y fueron colocados en una microcentrifuga a 10,000 rpm durante 10 minutos para la cuantificación de hematocrito, posteriormente se calculó el porcentaje utilizando una escala para hematocrito (Figura 9).

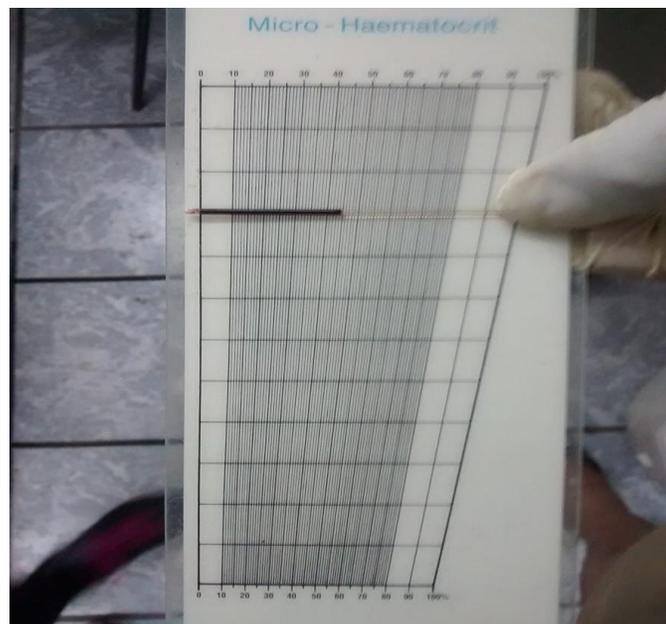


Figura 9. Análisis de hematocrito en una tabla de escalas para hematocrito.

2.10. Análisis enzimático

La determinación de la actividad enzimática fue llevada a cabo en el laboratorio de Nutrición Acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California. Para la extracción de las enzimas digestivas, se utilizaron 3 peces por tanque (9 peces por tratamiento), se cortaron trozos de 150 mg de intestino de la región anterior. Posteriormente se añadieron 300 ml de buffer Trisma® al 30 mM y 12 mM de CaCl_2 , a un pH de 7.5. Se maceraron los tejidos con un pistilo, y una vez homogenizados se

agregaron otros 450 ml de buffer. Las muestras se centrifugaron a 15,000 RPM por 20 minutos a 4°C y posteriormente se extrajo el sobrenadante. Los tubos Eppendorf con el sobrenadante, fueron introducidos a un ultracongelador a -80°C.

2.10.1. Cuantificación de las proteínas solubles

Para cuantificar las proteínas solubles se utilizó el método Bradford (1976). Todas las muestras fueron diluidas a 1:25. Se usaron 10 µL de muestra y se añadieron 240 µL de agua destilada. Se homogenizó la muestra y se extrajeron 10 µL, a esta se le añadió 200 µL de albumina de suero bovino (BSA), el volumen final fue de 210 µL. La curva patrón se realizó con diluciones de 0 a 0.5 de la solución stock (tabla 3). Posteriormente se leyeron las muestras en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go a 595 nm de longitud. Todas las muestras se realizaron por triplicado y la curva patrón se calculó en el programa Excel para Windows 2010 (figura 10).

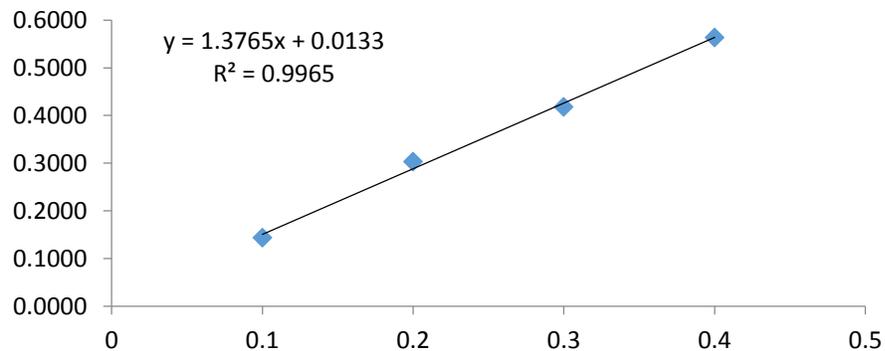


Figura 10. Curva patrón de Bradford.

Tabla 3. Preparación de la curva estándar de calibración para Bradford.

Dilución	μL de BSA	H_2O	Vol. Final (μL)
0	0	210	210
0.1	10	200	210
0.2	20	190	210
0.3	30	180	210
0.4	40	170	210
0.5	50	160	210

2.10.2. Proteasas alcalinas totales

Para la evaluación de la actividad de las proteasas alcalinas totales, se utilizó el buffer de extracción (BEX) con pH de 7.5 (Tris-HCL 0.03 M, CaCl₂ 0.012 M). Buffer de sustrato (Tris-HCL 0.1 M, CaCl₂ 0.010 M) a pH 9. El sustrato enzimático utilizado fue caseína al 1%. Por último, la solución de frenado (SF) estaba compuesta de TCA al 20%. El tejido utilizado fue intestino de tilapia, *O. niloticus*. El volumen final de este ensayo fue de 1010 μL y todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Se pipetearon en tubos Eppendorf 500 μL de Buffer de sustrato, a los tubos con la solución blanco, se les añadió 10 μL de BEX mientras que a los tubos para muestreo se añadió 10 μL de extracto enzimático. Posteriormente se agitaron con la mano todos los tubos, esto para homogenizarlos y se ajustó el pH a 7.5 con HCL (ácido clorhídrico). Los tubos se introdujeron en una estufa a 25°C por 15 minutos. Se procedió a añadir 500 μL de solución de frenado a todos los tubos, posteriormente se introdujeron a un refrigerador a 4°C por 10 minutos y pasado este tiempo se centrifugaron todas las muestras a 15,000 x g por 10 minutos a 4°C para precipitar la caseína no hidrolizada. Posteriormente se mide la absorbancia del sobrenadante (péptidos solubles en TCA) a 280 nm de longitud con un coeficiente de extinción molar de 0.008.

2.10.3. Leucina aminopeptidasa, quimotripsina y tripsina

Para la cuantificación de la leucina aminopeptidasa se utilizó la metodología de Maroux et al. (1973), se usó el sustrato L-leu (L-leucina-P-nitroanilida) a un pH 8 a una concentración de 1.2 mM. Para cuantificar la actividad de la enzima quimotripsina se usó la metodología de Del Mar (1979), se utilizó el sustrato SAPNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide) con pH 8 al 1 mM. Por último, para evaluar la actividad de la enzima tripsina se realizó una modificación a la metodología de Erlanger et al. (1961), se usó BAPNA (N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride al 1mM) a un pH 8. Todas las muestras se analizaron por duplicado. El extracto enzimático para leucina aminopeptidasa, fue diluido en una proporción de 1:4. El extracto enzimático para quimotripsina y tripsina se usó sin dilución alguna. El volumen final fue de 220 μ L. Para el blanco se añadieron 20 μ L de agua destilada y 200 μ L de sustrato enzimático (L-Leu, SAPNA y BAPNA respectivamente). Para las pruebas se añadieron 20 μ L de muestra y 200 μ L de sustrato enzimático (L-Leu, SAPNA y BAPNA respectivamente). Todas las muestras se corrieron en microplacas, estas fueron encubadas a 37°C por 20 minutos y se leyeron en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go a 410 nm de longitud con un coeficiente de extinción molar de 8.8.

2.10.4. Fosfatasa

Para la cuantificación de la actividad enzimática de fosfatasas alcalinas, se utilizaron tubos marca Eppendorf® de 1.5 ml en los cuales se añadieron 20 μ l de extracto enzimático de la parte anterior del intestino de tilapia. Se procedió a agregar 20 μ l de sustrato cromogenico (4-nitrophenyl-phosphate) a una concentración de 5 mM a un pH de 10.1 el cual se ajustó con NaOH, posteriormente se añadieron a cada tubo 100 μ l de glicina al 50 mM. Las muestras se trabajaron por duplicado y se agregó un blanco sin extracto enzimático. Se introdujeron en una microplaca dentro de un espectrofotómetro marca Thermo Scientific Multiskan Go, el cual agito por 10 segundos, procedió a incubar a 37 °C y se midió la absorbancia a 405 nm con un coeficiente de extinción molar de 8.18.

2.10.5. α -amilasa

Para la cuantificación de la actividad de la α -amilasa se tuvo que realizar nuevamente una curva patrón siguiendo el método descrito por Bradford (1976). Esto debido a que la actividad de estas enzimas se leyó con celdas de plástico individuales y no con microplaca. El método utilizado para evaluar la actividad de α -

amilasa en tejido intestinal de tilapia fue el descrito por Robyt y Whelan (1968) en el cual se modificó el tiempo de incubación ya que este puede variar dependiendo de la especie, en este caso se modificó de 30 minutos a 10 minutos de incubación y posteriormente se leyeron las muestras en un espectrofotómetro marca Multiskan Go a 600 nm con un coeficiente de extinción molar de 8.8 (Revisar anexos para metodología de preparación de los reactivos).

2.11. Análisis estadístico

Para los resultados biométricos, así como para los índices biológicos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con la prueba de comparaciones de varianzas de Welch y con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, con previa revisión de los supuestos estadísticos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Todos los análisis fueron realizados con el software Minitab 17 para Windows.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Calidad de agua

3.1.1. Amonio

En la primera semana del experimento se observó un aumento de amonio en los todos los tratamientos, sin embargo, en el control negativo (C-) el nivel de amonio fue menor debido a los recambios diarios del 20% del volumen total (Figura 11). A lo largo del experimento, los niveles de amonio en los tratamientos con biofloc e inoculados con probióticos fueron similares sin diferencias significativas. Sin embargo, la concentración final de C- fue significativamente menor ($P<0.001$) comparada con el resto de los tratamientos como se observa en la figura 11. A lo largo de la segunda semana del bioensayo se observó una disminución en la concentración de amonio probablemente debido a la maduración adecuada del sistema con la actividad de bacterias nitrificantes de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*, las cuales oxidan el amonio en nitritos.

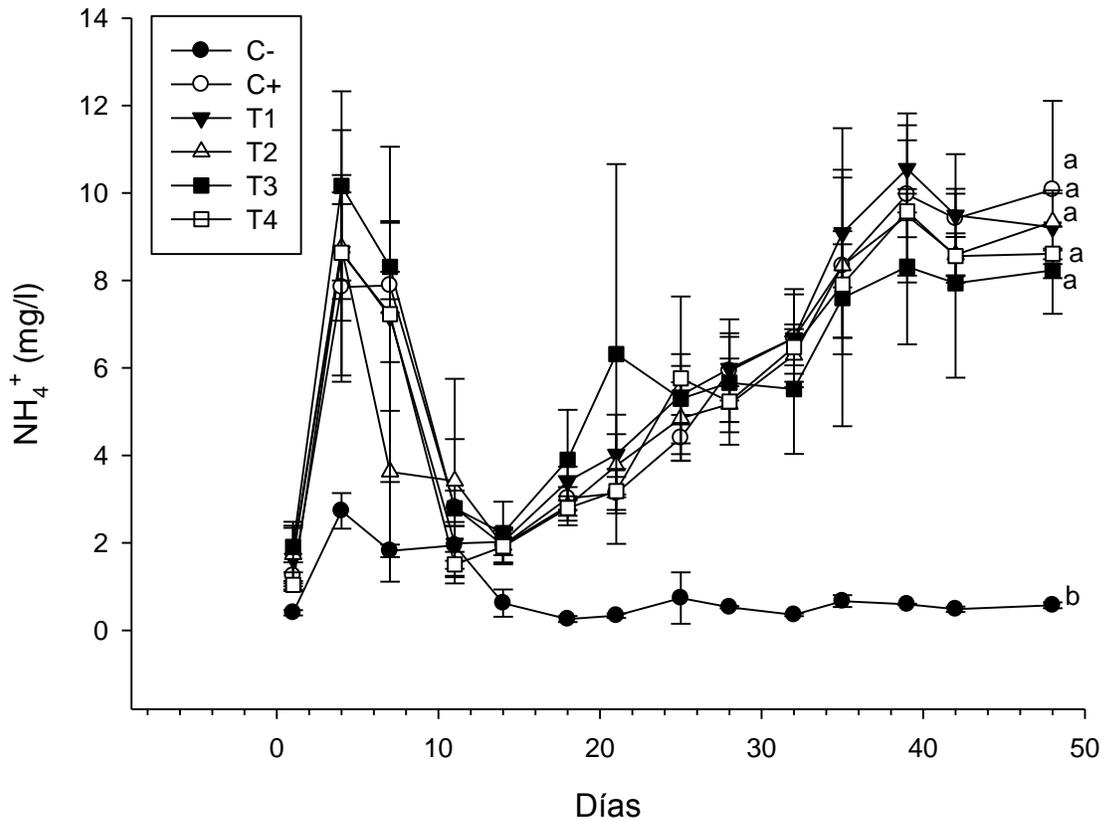


Figura 11. Concentración promedio y desviación estándar de la concentración de amonio durante el periodo de cultivo. Diferentes siglas indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

3.1.2. Nitritos

Al final del experimento no se encontraron diferencias significativas ($P = 0.620$) entre tratamientos (Figura 12). Sin embargo, entre los días 10 y 30 se observó un aumento muy marcado en la concentración de nitritos, alcanzando los 12 mg/l. Este aumento concuerda con el periodo de disminución del amonio (figura 11) que seguramente fue transformado en nitritos por las bacterias nitrificantes. Del día 30 en adelante la concentración de nitrito disminuyó de forma similar en todos los tratamientos, alcanzando una concentración final cerca de 0 mg/l en todos los tratamientos.

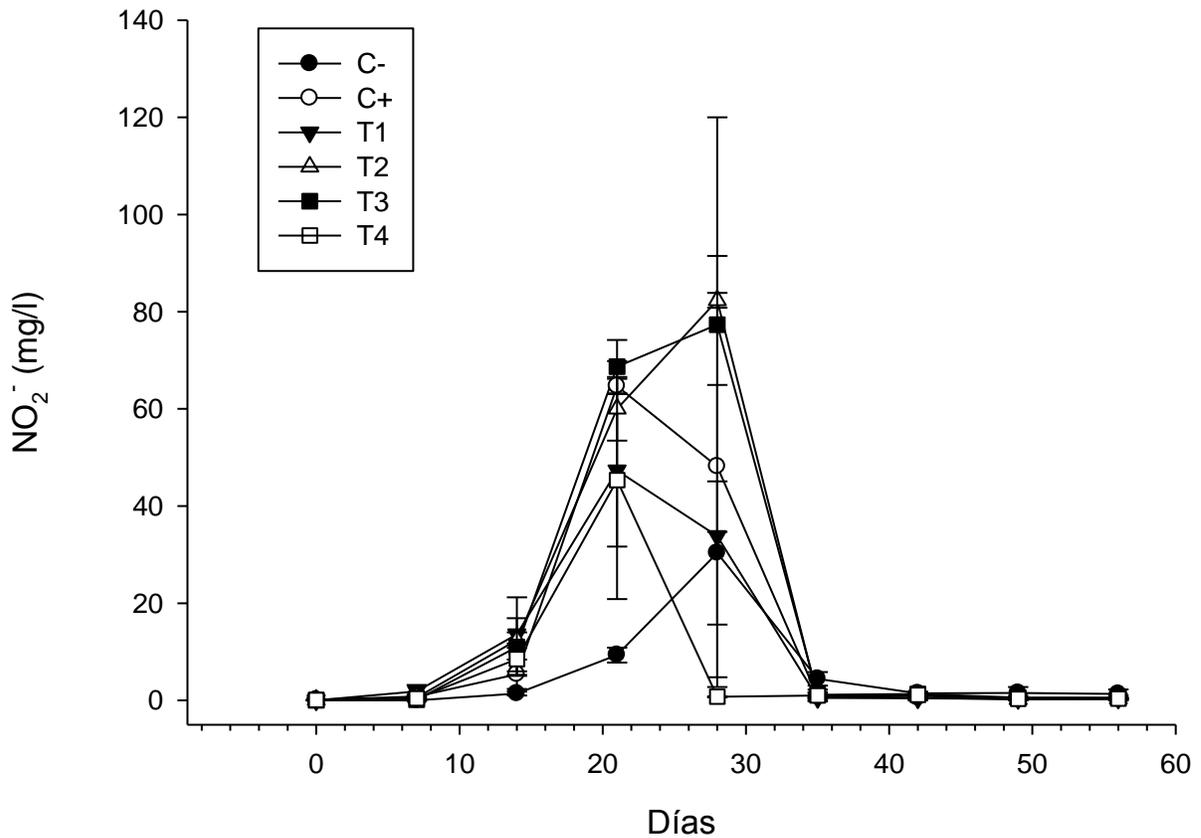


Figura 12. Concentración promedio y desviación estándar de la concentración de nitrito durante el periodo de cultivo. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.620$).

3.1.3. Nitratos

La concentración de nitratos aumentó conforme los nitritos comenzaron a disminuir (figura 13). Esto se debe a un proceso llamado nitratación en el cual bacterias del género *Nitrobacter* oxidan el nitrito a nitrato. Al final del experimento, el tratamiento C- presentó valores significativamente más bajos ($P<0.001$) en la concentración de nitritos comparado con el resto de los tratamientos. La concentración final fue cercana a 0 mg/l de nitratos, esto atribuido a los recambios diarios del 20% del volumen total del agua en el tanque.

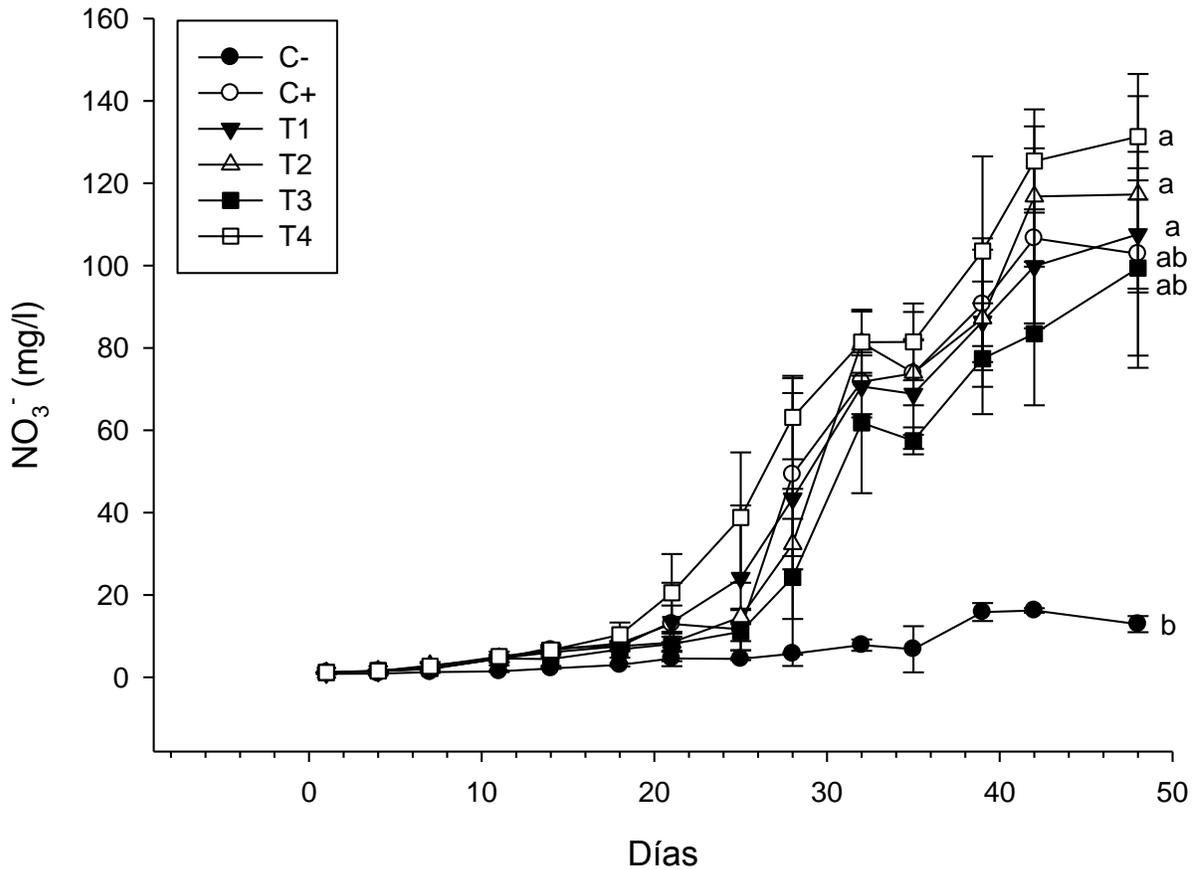


Figura 13. Concentración promedio y desviación estándar de la concentración de nitratos durante el periodo de cultivo. Diferentes siglas indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

3.1.4. Alcalinidad

La concentración de bicarbonatos a lo largo de las ocho semanas del bioensayo fluctuó de manera independiente en cada tratamiento sin relación alguna. Sin embargo, el C- presentó los niveles más bajos de alcalinidad y a partir de la tercera semana se mantuvo bajo. Al finalizar el experimento, el C- presentó concentraciones de bicarbonato, significativamente menores ($P=0.019$) al T4, sin embargo, no hubo diferencias con los demás tratamientos. Así mismo el T4 presentó la concentración más alta de bicarbonato, sin encontrarse diferencias significativas con el resto de los tratamientos (figura 14). La concentración de carbonatos totales promedio de los tratamientos se mantuvo entre 50 y 150 mg/l.

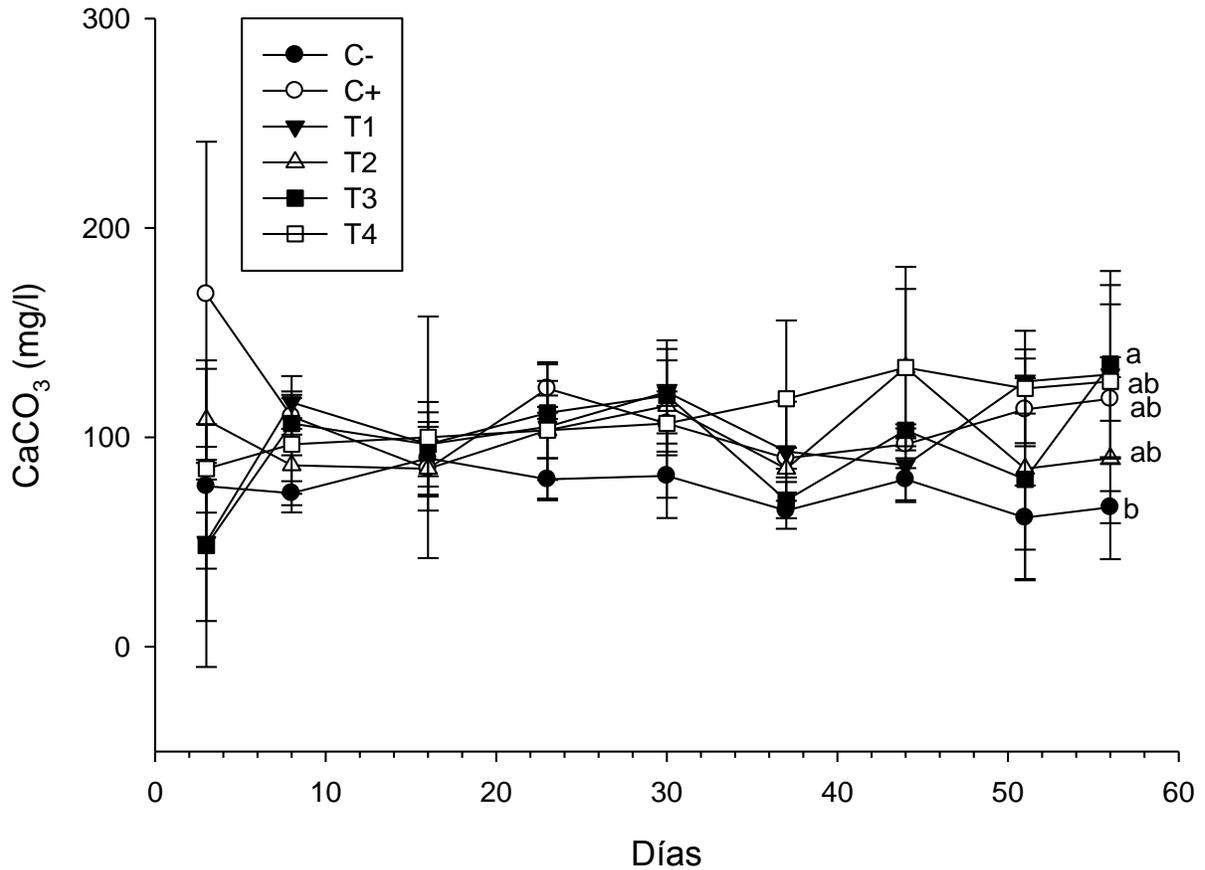


Figura 14. Concentración promedio y desviación estándar de la concentración de bicarbonato durante el periodo de cultivo. Diferentes siglas indican diferencias significativas ($P=0.019$).

3.1.5. pH

Los valores promedio de pH a lo largo del experimento fueron similares entre los tratamientos con biofloc. En el tratamiento C- los niveles de pH se mantuvieron por encima de los demás tratamientos, excepto que durante la tercera semana los valores bajaron a niveles similares a los otros tratamientos, para posteriormente restablecerse por encima de 8. Al final del experimento, el tratamiento C- presentó el nivel de pH más alto, siendo significativamente mayor ($P=0.005$) al T4, pero sin diferencias con el resto de los tratamientos (figura 15).

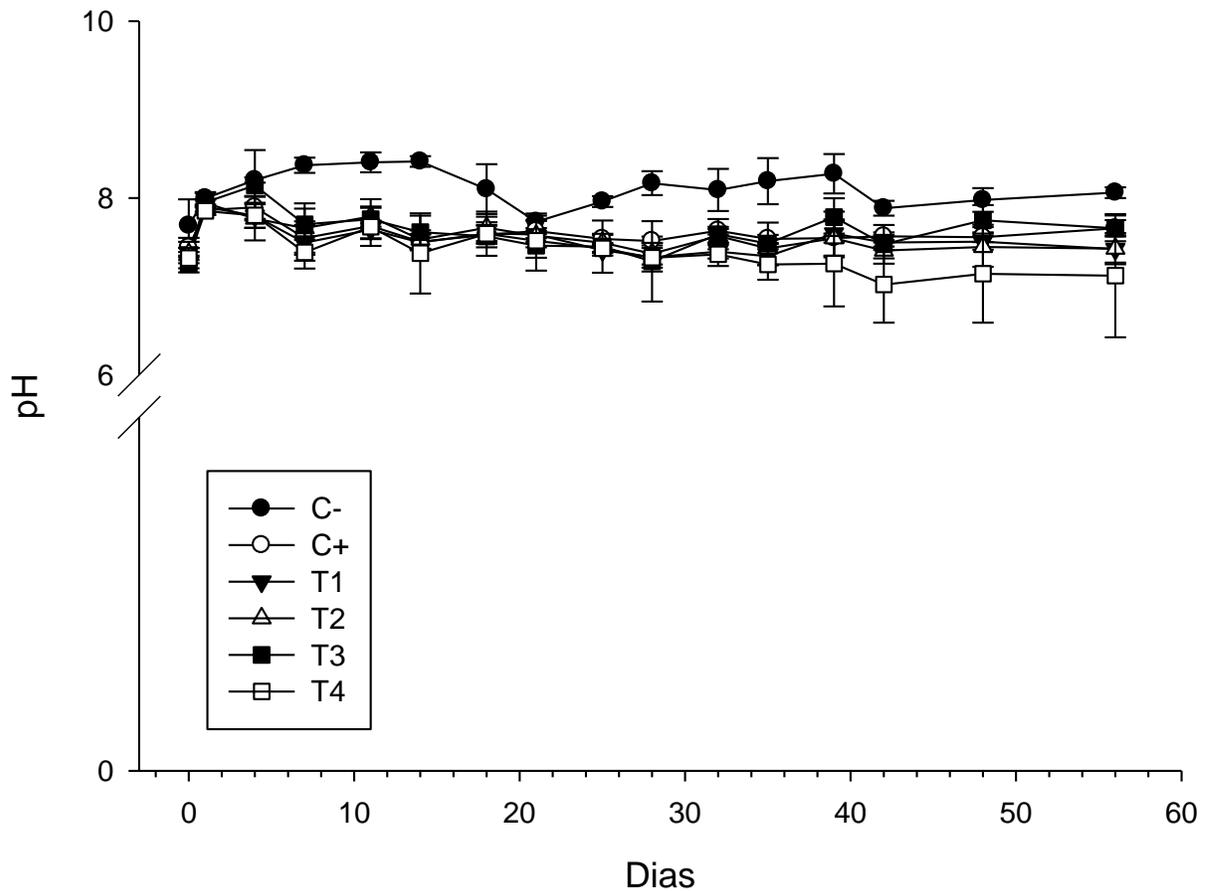


Figura 15. Valores promedio y desviación estándar de pH durante el periodo de cultivo. Diferentes siglas indican diferencias significativas ($P=0.019$).

3.1.6. Flóculos

De manera general el volumen promedio de los flóculos aumento a lo largo de las ocho semanas de experimento con excepción del control negativo (C-). Al inicio todos los tratamientos presentaron valores cercanos a 0 ml/L. El C- siempre mantuvo su volumen de flóculos cercano a 0 ml/L debido a los recambios diarios del 20% del volumen total de sus tanques. El T4 y C+ presentaron valores significativamente ($P=0.001$) mayores al C- y T3. En los tratamientos T1, T2 no se observaron diferencias significativas con los demás tratamientos con biofloc pero si se encontraron diferencias significativas ($P=0.001$) con el C- (figura 16).

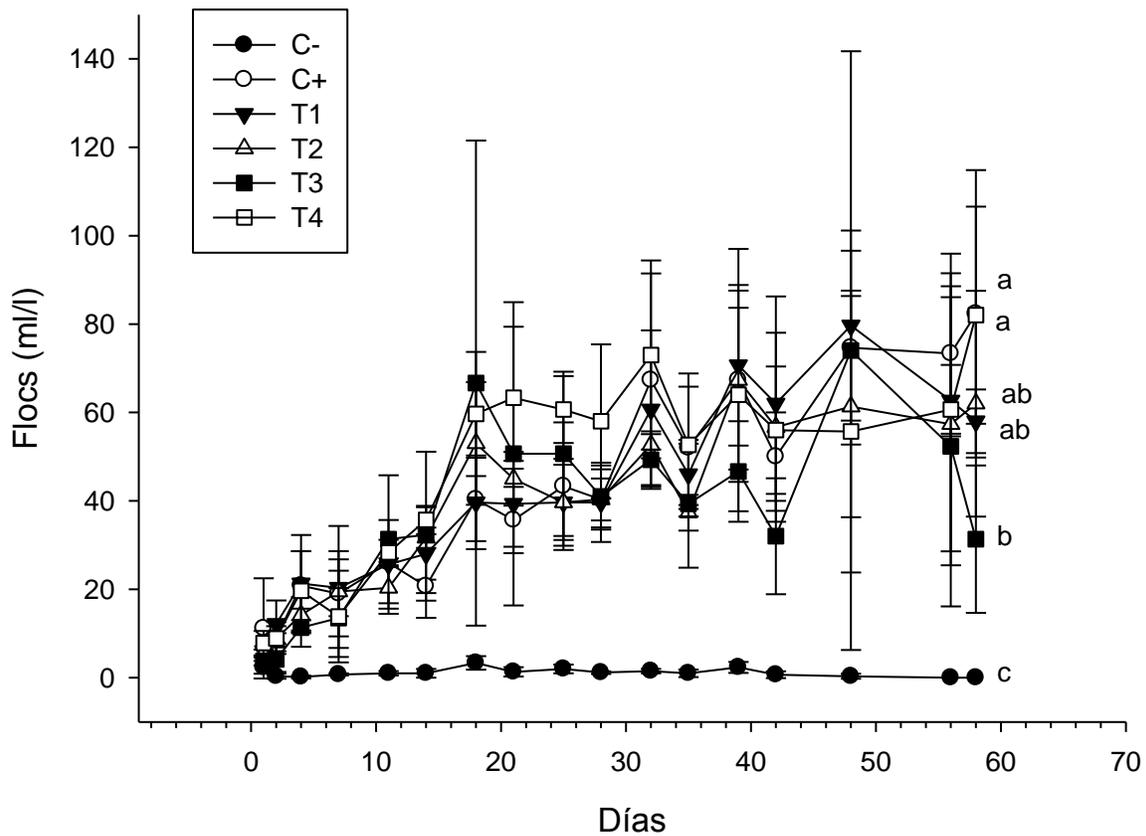


Figura 16. Volumen promedio y desviación estándar de flóculos durante el periodo de cultivo. Diferentes siglas indican diferencias significativas ($P=0.001$).

3.1.7. Temperatura

La temperatura del agua se comportó de la misma forma en todos los tratamientos, con valores a lo largo de las ocho semanas de experimentación entre los 26 y 36°C. Las variaciones semanales de temperatura se produjeron debido a presencia de nubes y lluvias. Así mismo la temperatura fue decreciendo conforme se acercaba el invierno. No se encontraron diferencias significativas ($P=0.419$) entre tratamientos durante el experimento (figura 17).

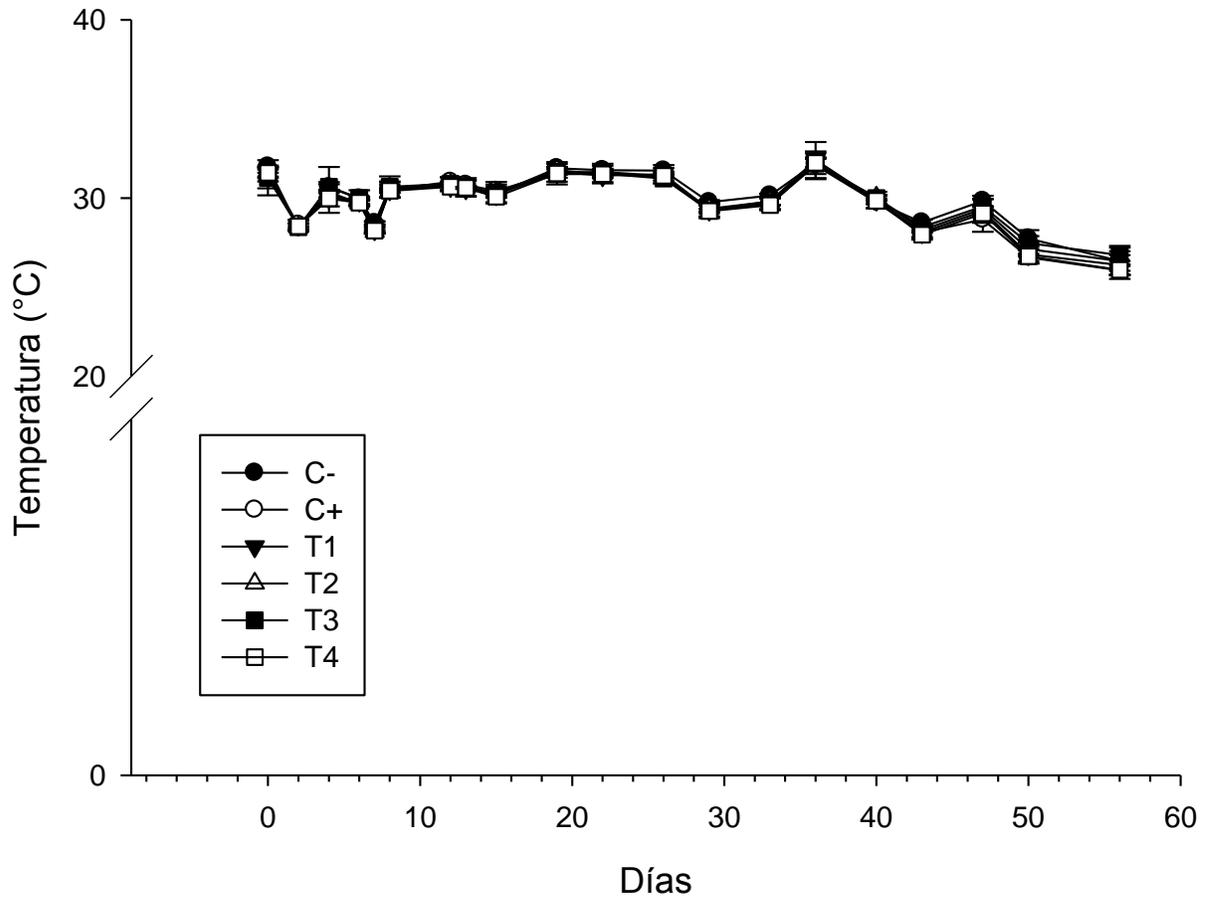


Figura 17. Temperatura promedio y desviación estándar de flóculos durante el periodo de cultivo. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.419$).

3.1.8. Oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto en el agua fue baja durante los primeros días del experimento debido a que se utilizaron mangueras de aerotube® defectuosas y fueron cambiadas por mangueras nuevas a los pocos días. Posteriormente la concentración de oxígeno disuelto en los tratamientos se mantuvo en niveles óptimos para esta especie, sin presentar diferencias significativas ($P=0.061$) entre ellos (figura 18).

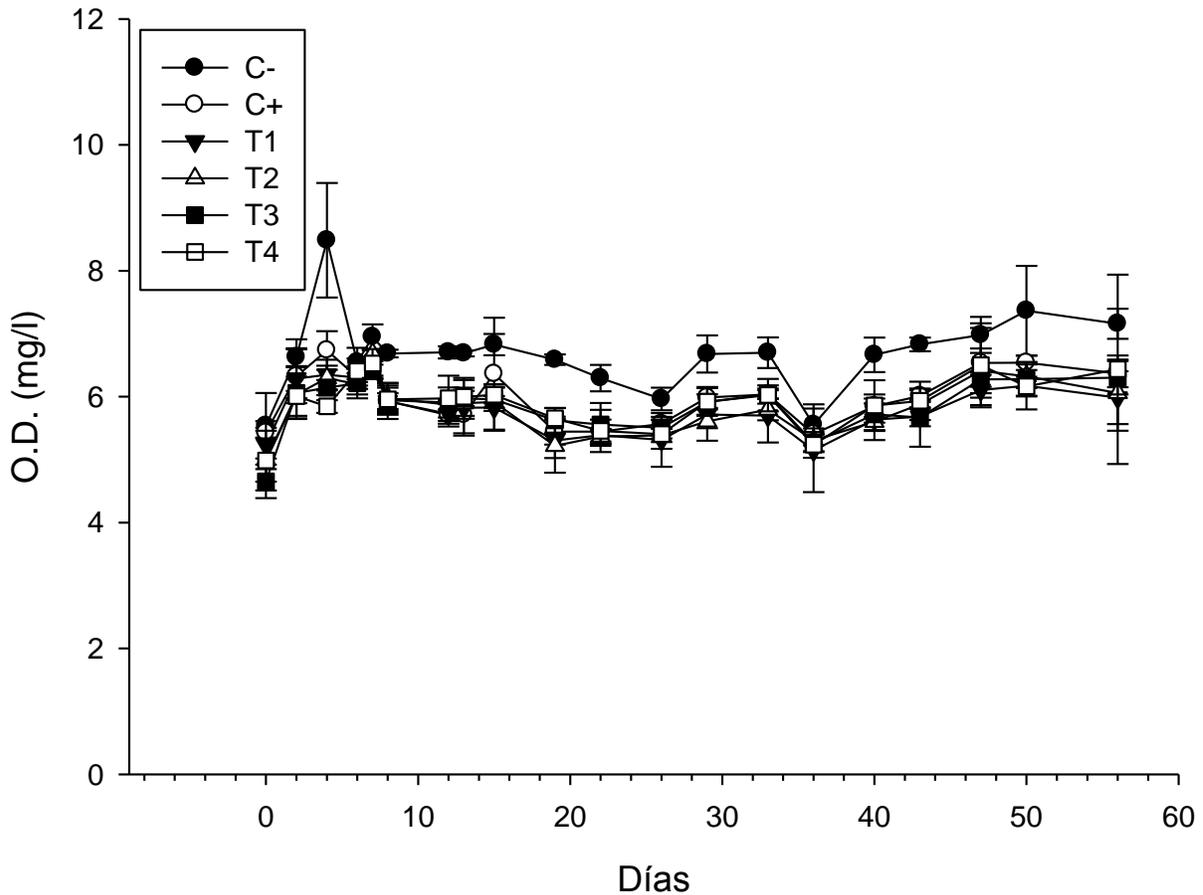


Figura 18. Concentración promedio y desviación estándar del oxígeno disuelto durante el periodo de cultivo. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.061$).

3.1.9. Sólidos disueltos y conductividad

La concentración de sólidos disueltos totales (SDT) fue similar en todos los tratamientos con biofloc (C+, T1, T2, T3 y T4), aumentando de manera constante a lo largo del tiempo y sin presentar diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, el control negativo (C-) presentó valores significativamente ($P<0.001$) menores que el resto de los tratamientos y la concentración total se mantuvo por debajo de los 200 mg/l (Figura 19). De forma similar, no se encontraron diferencias significativas en los valores de la conductividad entre los tratamientos con biofloc (C+, T1, T2, T3 y T4) y con tendencia a aumentar a lo largo del tiempo. El C- presentó niveles de conductividad menores y fue significativamente menor ($P<0.001$) comparado con el resto de los tratamientos (Figura 20).

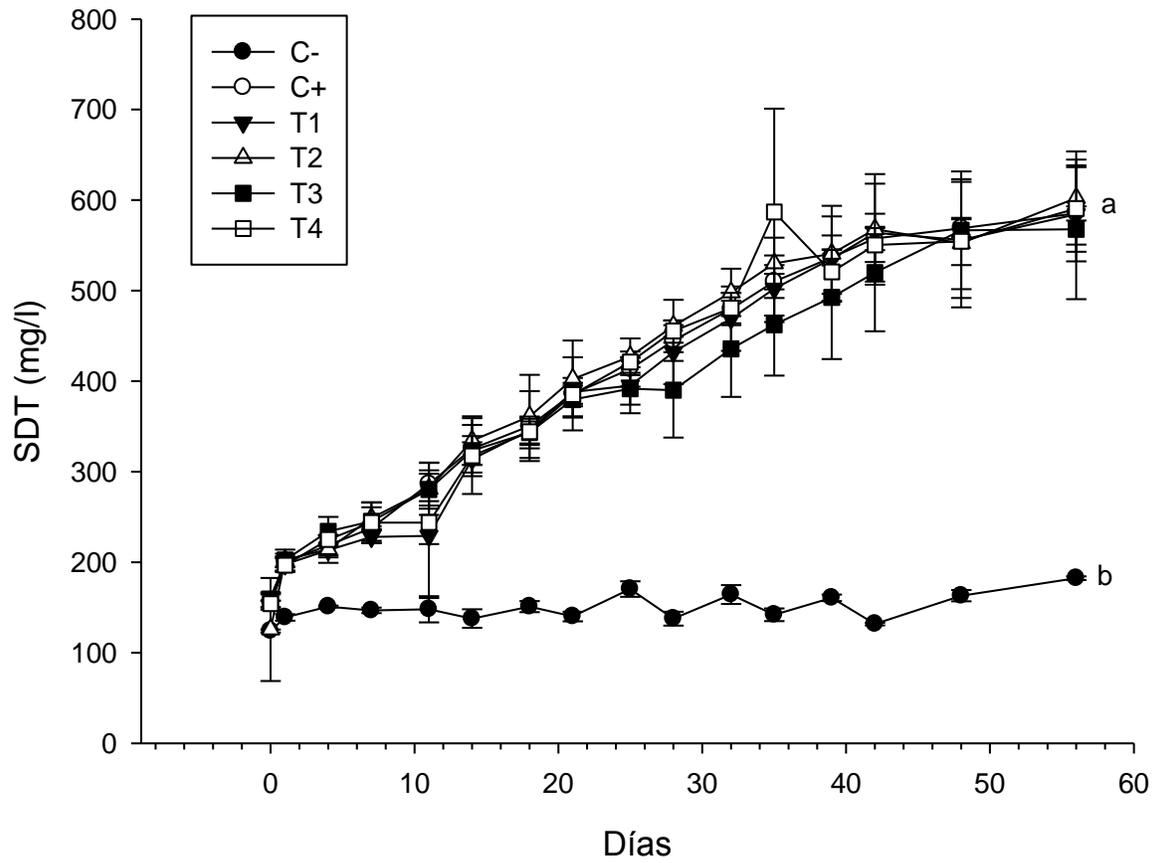


Figura 19. Concentración promedio y desviación estándar de los sólidos disueltos totales durante el periodo de cultivo. Diferentes siglas indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

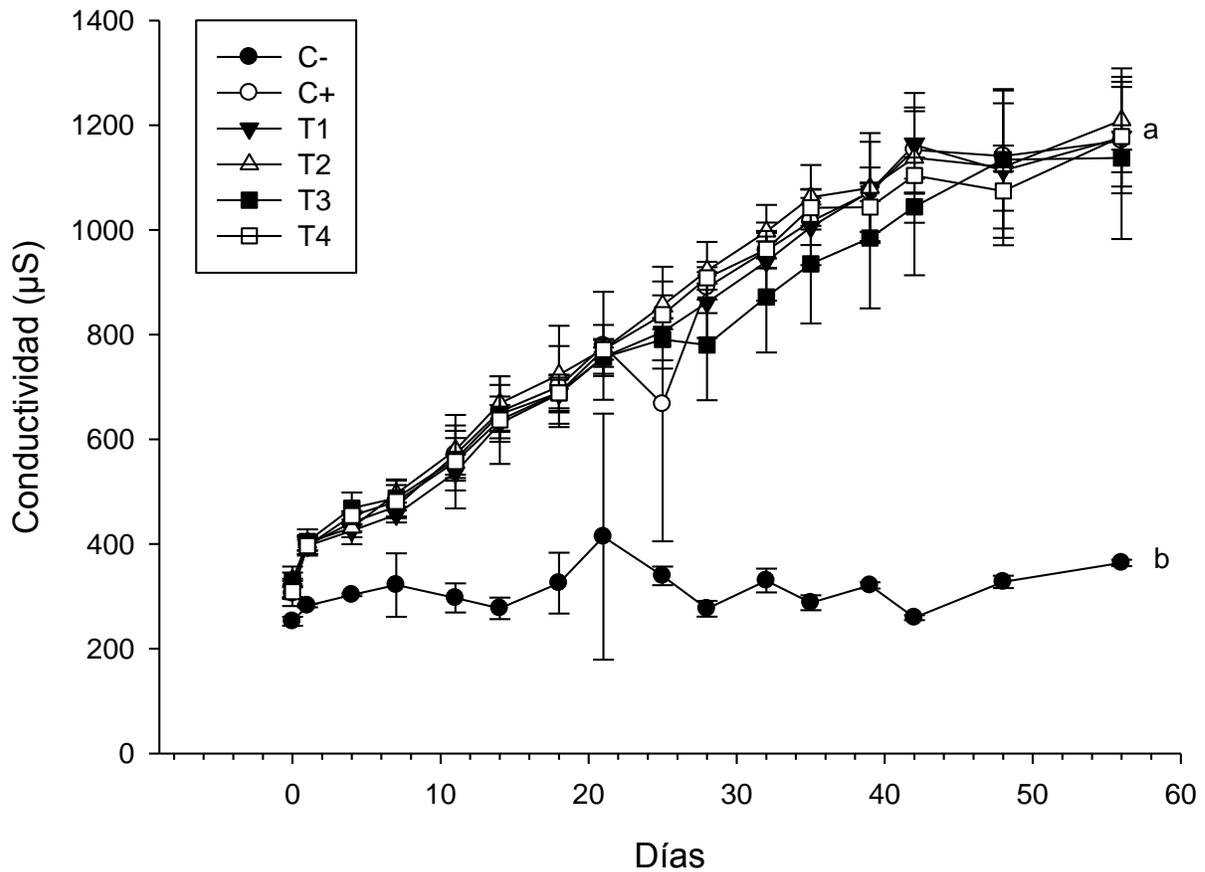


Figura 20. Conductividad promedio y desviación estándar del agua durante el periodo de cultivo. Diferentes siglas indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

3.2. Parámetros biológicos

3.2.1. Crecimiento

Se ha observado y comprobado que el uso de sistemas tipo biofloc en cultivo de tilapia y otros organismos como bagre y camarón, promueve el crecimiento debido a la disponibilidad continua de alimento rico en proteínas. Así mismo, la adición constante de probióticos y enzimas al sistema resulto positivo al haber potencializado el crecimiento (Figura 21). Se puede observar que el tratamiento T4, al cual se le añadió el probiótico Aquablend por ocho semanas, resulto en el mayor crecimiento, alcanzando un peso final promedio de 101.83 ± 24.23 g. Significativamente mayor a los demás tratamientos. Sin embargo, los peces

del tratamiento homologado, pero con adición del mismo probiótico por cuatro semanas (T3) presentaron un peso promedio individual de 79.08 ± 19.53 g. Así mismo, se observó que las tilapias adicionadas con el probiótico Aquaprotect, por ocho semanas (T2) presentaron un crecimiento promedio de 89.32 ± 24.78 g. En este caso no hubo diferencia significativa ($P < 0.001$) entre aplicar el probiótico Aquaprotect por ocho, cuatro semanas o no usarlo, ya que el T1 presentó un peso promedio de 85.29 ± 22.26 g y el control positivo (C+) mostró un peso promedio de 88.65 ± 21.48 g. Sin embargo, se pudo observar una diferencia significativa ($P < 0.001$) entre el control negativo (C-) y todos los demás tratamientos ya que éste presentó el menor peso promedio con un valor de 54.63 ± 16.71 gramos. En la figura 21, se puede observar que reducir la relación Carbono: Nitrógeno (C:N) no resultó en un efecto negativo en el crecimiento de las tilapias así como otros indicadores de desarrollo.

En cuanto a la tasa de crecimiento específico (TCE) se realizó el cálculo al finalizar el cultivo y los resultados se muestran en la tabla 4. Se encontró que los tratamientos T4, T2, C+ y T3 tuvieron el mayor crecimiento específico con valores de $3.58 \pm 0.15\%$, $3.41 \pm 0.17\%$, $3.41 \pm 0.05\%$ y $3.31 \pm 0.15\%$ respectivamente, sin presentar diferencias significativas ($P < 0.001$) entre ellos. Los peces en el tratamiento C- resultaron en TCE significativamente menores con un valor de $2.56 \pm 0.02\%$, mientras que el T1 no presentó diferencias significativas ($P < 0.001$) con respecto al resto de los tratamientos.

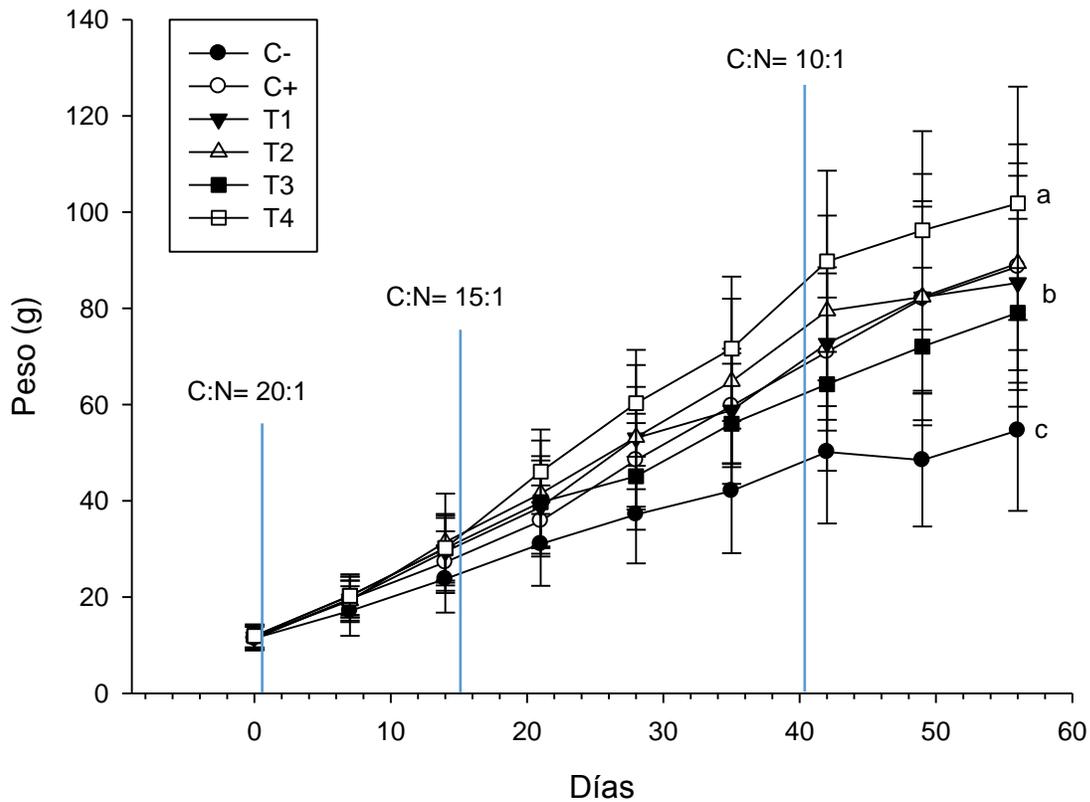


Figura 21. Crecimiento promedio y desviación estándar de las tilapias en el ciclo experimental. Las líneas azules indican la fecha en la que la relación Carbono: Nitrógeno (C:N) fue modificada. Diferentes siglas indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

3.2.2. Índices de eficiencia alimenticia

Los resultados del factor de conversión alimenticia (FCA) se muestran en la tabla 4. Siendo el C+, T1 y T3 los tratamientos con un mejor FCA, con valores de 1.10 ± 0.06 , 1.14 ± 0.07 y 1.12 ± 0.06 respectivamente sin presentar diferencias significativas ($P=0.037$) entre ellos. El C- presentó el valor de FCA más alto con 1.51 ± 0.1 , mientras que el T2 y T4 no presentaron diferencias significativas ($P=0.037$) con los otros tratamientos.

En lo que respecta a la tasa de eficiencia proteica (TEP) los resultados se presentan en la tabla 4. Los tratamientos que presentaron una mayor eficiencia fueron el C+, T1 y T3 con 2.83 ± 0.16 , 2.74 ± 0.16 y 2.79 ± 0.16 respectivamente sin presentar diferencias significativas ($P=0.018$) entre ellos. Mientras que el

tratamiento con menor eficiencia proteica fue el C- con 2.07 ± 0.13 . Los tratamientos T2 y T4 no presentaron diferencias significativas ($P=0.018$) con el resto de los tratamientos.

3.2.3. Supervivencia

La supervivencia no presentó diferencias significativas ($P=0.748$) entre los tratamientos con valores que oscilaron entre el 91% y 99% (Tabla 4). Sin embargo, una unidad experimental del tratamiento T4 sufrió grandes mortalidades y no se sabe con exactitud que factor promovió este fenómeno, pero se considera que no fue asociado al tratamiento.

3.2.4. Hematocrito

La estimación de glóbulos rojos en la sangre fue evaluada al concluir el experimento, utilizando a 5 organismos de cada tanque. El mayor porcentaje de hematocrito se encontró en los tratamientos T3, C+ y T4 con valores de $38.40 \pm 4.9\%$, $36.00 \pm 4.64\%$ y $36.07 \pm 3.28\%$ respectivamente. El control negativo (C-) presentó el menor porcentaje de hematocrito con un valor de $30.43 \pm 8.98\%$ siendo significativamente ($P<0.001$) menor que los tratamientos C+, T3 y T4. Los tratamientos T1 y T2 no presentaron diferencias significativas ($P<0.001$) con el resto de los tratamientos (Tabla 4).

3.2.5. Índice hepatosomático (IHS)

En lo que respecta al índice hepatosomático (IHS) el mayor valor se encontró en el T2 (2.24 ± 0.67) y C+ (2.23 ± 0.46), mientras que el menor valor fue observado en el C- (1.56 ± 0.39) siendo significativamente ($P<0.001$) diferente al resto de los tratamientos. Los tratamientos T1, T3 y T4 no mostraron diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos (tabla 4).

Tabla 4. Promedio y desviación estándar de los parámetros biológicos de los diferentes tratamientos con probióticos.

Variables	Control Negativo (C-)	Control Positivo (C+)	Probiótico Aquaprotect 4 Semanas (T1)	Probiótico Aquaprotect 8 Semanas (T2)	Probiótico Aquablend 4 Semanas (T3)	Probiótico Aquablend 8 Semanas(T4)
Peso Promedio Inicial (g)	11.43 ± 2.4	11.38 ± 2.45	11.66 ± 2.45	11.70 ± 2.54	11.92 ± 2.42	11.92 ± 2.35
Peso Promedio Final (g)	54.63 ± 16.71 ^c	88.65 ± 21.48 ^b	85.29 ± 22.26 ^b	89.32 ± 24.78 ^b	79.08 ± 19.53 ^b	101.83 ± 24.23 ^a
Biomasa Inicial (kg)	1.03 ± 0.01	1.01 ± 0.01	1.05 ± 0.01	1.02 ± 0.02	1.07 ± 0.01	1.01 ± 0.03
Biomasa Final (kg)	4.2 ± 0.05	6.4 ± 0.05	6.5 ± 0.3	6.43 ± 0.33	6.4 ± 0.2	7.02 ± 0.16
Ganancia en biomasa (kg)	3.07 ± 0.4 ^b	5.4 ± 0.43 ^a	5.43 ± 0.3 ^{ab}	5.4 ± 0.31 ^{ab}	5.33 ± 0.2 ^{ab}	6 ± 0.16 ^a
Alimento suministrado (kg)	4.63 ± 0.16 ^b	6 ± 0.16 ^{ab}	6.18 ± 0.2 ^a	6.45 ± 0.35 ^a	6 ± 1.7 ^{ab}	7.1 ± 0.13 ^a
Proteína Suministrada (kg)	1.5 ± 0.5 ^b	1.9 ± 0.05 ^{ab}	1.98 ± 0.06 ^{ab}	2.06 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.05 ^{ab}	2.27 ± 0.42 ^a
Biomasa ganada (%)	398.46 ± 5.3 ^b	630.50 ± 16.19 ^a	617.59 ± 71.85 ^{ab}	632.15 ± 55.6 ^{ab}	597.18 ± 48.56 ^{ab}	692.73 ± 53.31 ^a
Supervivencia (%)	98.89 ± 1.92	95.56 ± 5.09	98.89 ± 1.92	95.56 ± 5.09	98.89 ± 1.92	91.11 ± 10.18
Ganancia promedio en g por día	0.77 ± 0.10 ^b	1.38 ± 0.16 ^a	1.31 ± 0.23 ^{ab}	1.39 ± 0.33 ^{ab}	1.20 ± 0.19 ^{ab}	1.61 ± 0.28 ^a
TEP	2.07 ± 0.13 ^b	2.83 ± 0.16 ^a	2.74 ± 0.16 ^a	2.62 ± 0.05 ^{ab}	2.79 ± 0.16 ^a	2.65 ± 0.3 ^{ab}
FCA	1.51 ± 0.1 ^a	1.10 ± 0.06 ^b	1.14 ± 0.07 ^b	1.19 ± 0.03 ^{ab}	1.12 ± 0.06 ^b	1.18 ± 0.14 ^{ab}
TCE %	2.56 ± 0.02 ^b	3.41 ± 0.05 ^a	3.37 ± 0.22 ^{ab}	3.41 ± 0.17 ^a	3.31 ± 0.15 ^a	3.58 ± 0.15 ^a
Hematocrito (%)	30.43 ± 8.98 ^b	36.00 ± 4.64 ^a	33.40 ± 4.52 ^{ab}	32.33 ± 6.85 ^{ab}	38.40 ± 4.9 ^a	36.07 ± 3.28 ^a
IHS	1.56 ± 0.39 ^b	2.23 ± 0.46 ^a	2.17 ± 0.76 ^{ab}	2.24 ± 0.67 ^a	1.95 ± 0.37 ^{ab}	2.22 ± 0.82 ^{ab}

Nota: Diferentes siglas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

3.3.- Actividad enzimática

3.3.1. Proteasas Alcalinas Totales

Por lo general los peces mantenidos en sistemas biofloc y adicionados con probióticos presentaron niveles de proteasas alcalinas totales significativamente mayores con excepción de los peces en el tratamiento T3 (Figura 22). Así mismo, la actividad de proteasas alcalinas totales en los peces de los tratamientos control (C+ y C-) fueron significativamente menores y no difirieron significativamente del tratamiento T3.

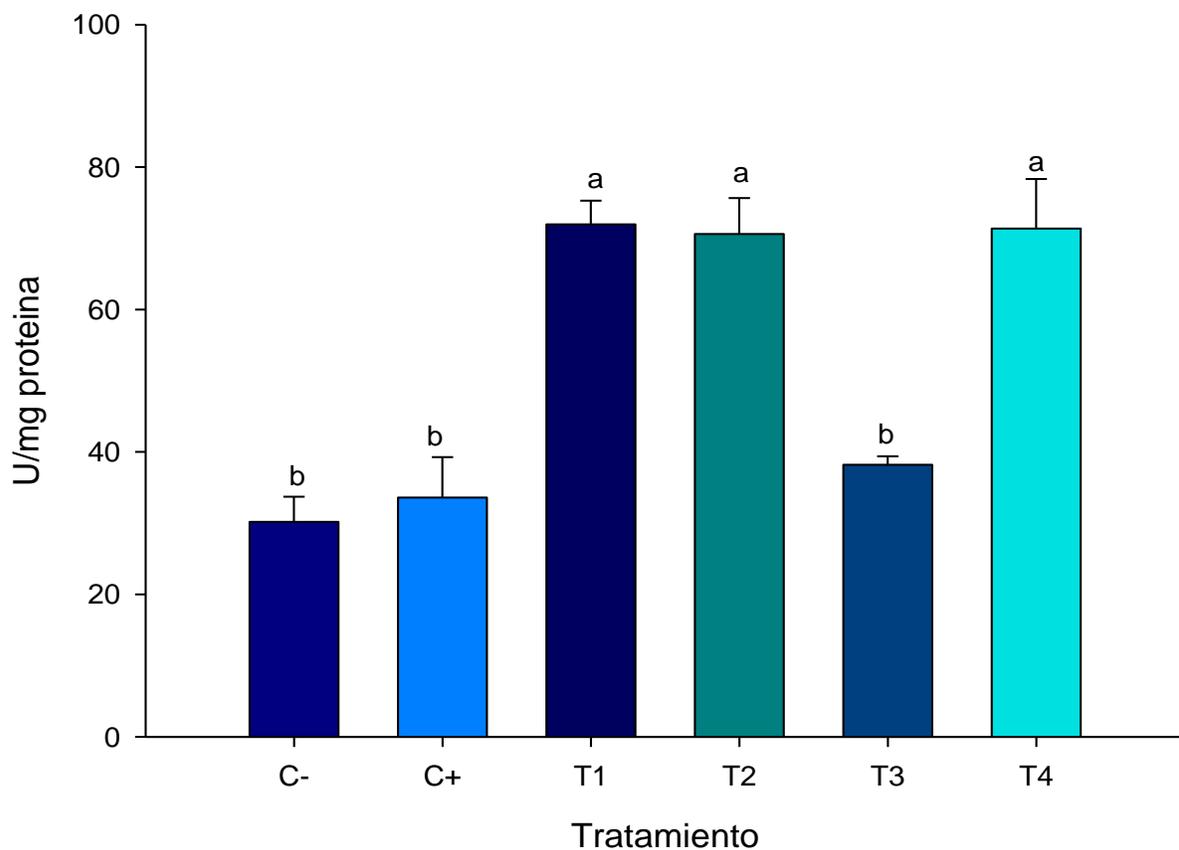


Figura 22. Actividad específica de proteasas alcalinas totales en intestino de tilapia *Oreochromis niloticus* Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc. Se muestran promedios y desviación estándar; n=15; diferentes siglas indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

3.3.2. Tripsina

Los niveles de actividad de tripsina de los diferentes tratamientos (C-, C+, T1, T2, T3 y T4) en los peces cultivados por ocho semanas en tanques sin biofloc y con biofloc se presentan en la figura 23. La actividad de la tripsina en los peces del T4 (adicionado con probiótico Eco-Aquablend® por 8 semanas) fue significativamente mayor ($P < 0.001$) al resto de los tratamientos. Así mismo, el nivel de tripsina de los organismos cultivados en el T1 (adicionado con probiótico Eco-Aquaprotect® por 4 semanas) fue significativamente mayor que los peces de los tratamientos C-, T2 y T3, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto al C+ (Figura 23).

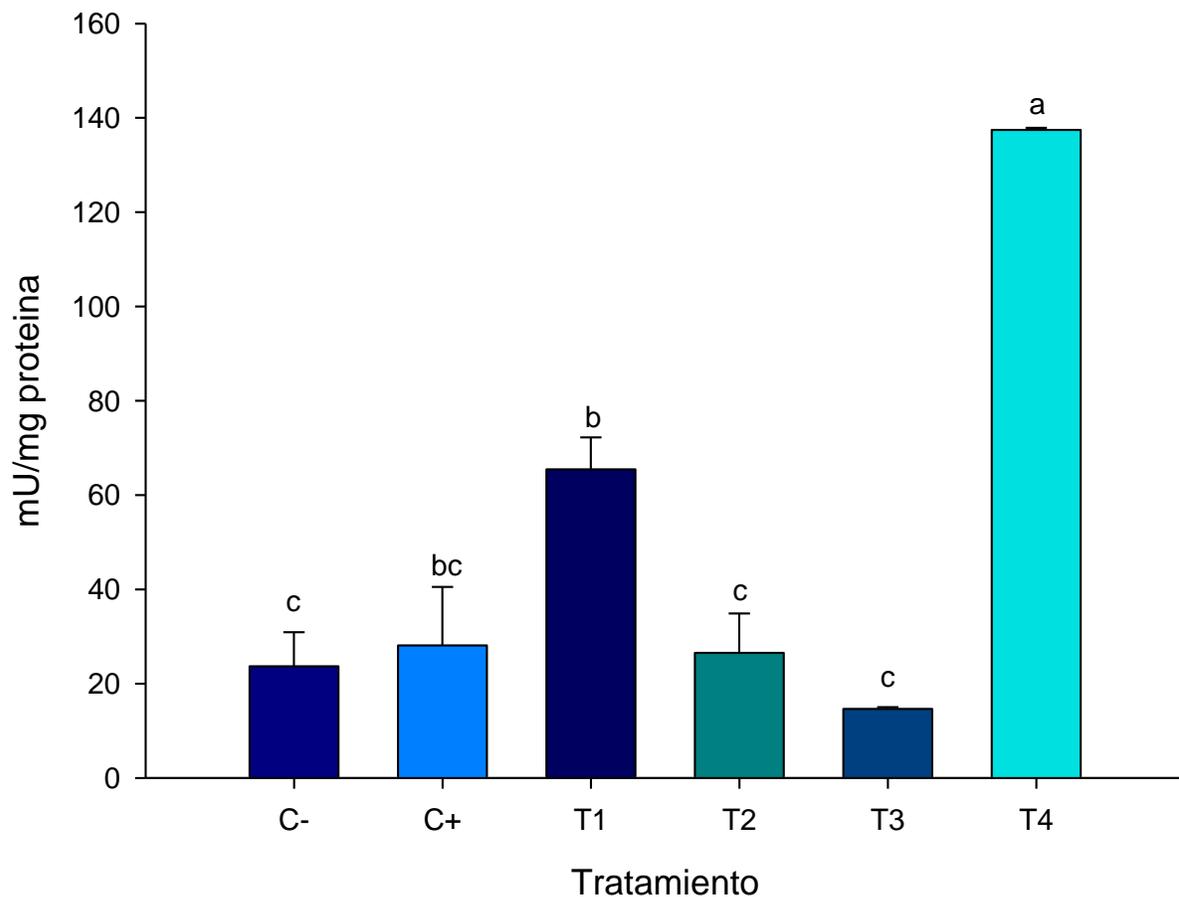


Figura 23. Actividad específica de tripsina en intestino de tilapia *Oreochromis niloticus* Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc. Se muestran promedios y desviación estándar; n=15; diferentes siglas indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

3.3.3. Quimotripsina

La actividad de la quimotripsina en cultivo con y sin biofloc por ocho semanas se muestra en la Figura 24. Los peces del tratamiento T4 (adicionado con probiótico Eco-Aquablend® por 8 semanas) resultaron con una actividad significativamente mayor ($P<0.001$) de quimotripsina con respecto al resto de los tratamientos (C-, C+, T1, T2 y T3) (Figura 24).

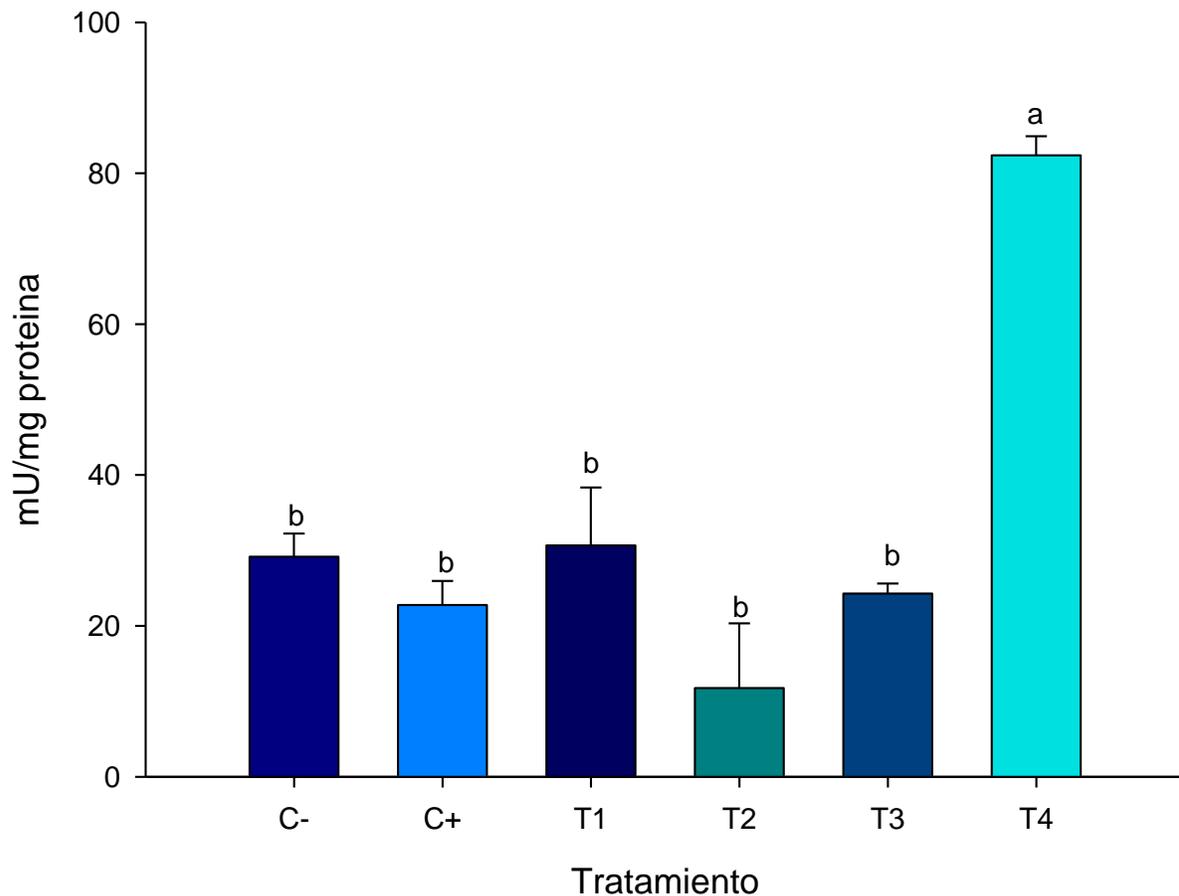


Figura 24. Actividad específica de quimotripsina en intestino de tilapia *Oreochromis niloticus* Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc. Se muestran promedios y desviación estándar; $n=15$; diferentes siglas indican diferencias significativas ($P<0.001$).

3.3.4. Leucina aminopeptidasa

La actividad intestinal de la leucina aminopeptidasa en los peces cultivados por ocho semanas en tanques con biofloc (C+, T1, T2, T3 y T4) fue significativamente menor ($P<0.001$) que aquellos cultivados en un sistema con recambios (C-). Sin embargo, los intestinos de los peces en el tratamiento T1 (adicionado con probiótico Eco-Aquaprotect® por 4 semanas) presentaron mayor actividad específica que el resto de los tratamientos con biofloc, siendo significativamente mayor ($P<0.001$) que el C+, T2 y T4, pero no hubo diferencias significativas con respecto al T3 (Figura 25).

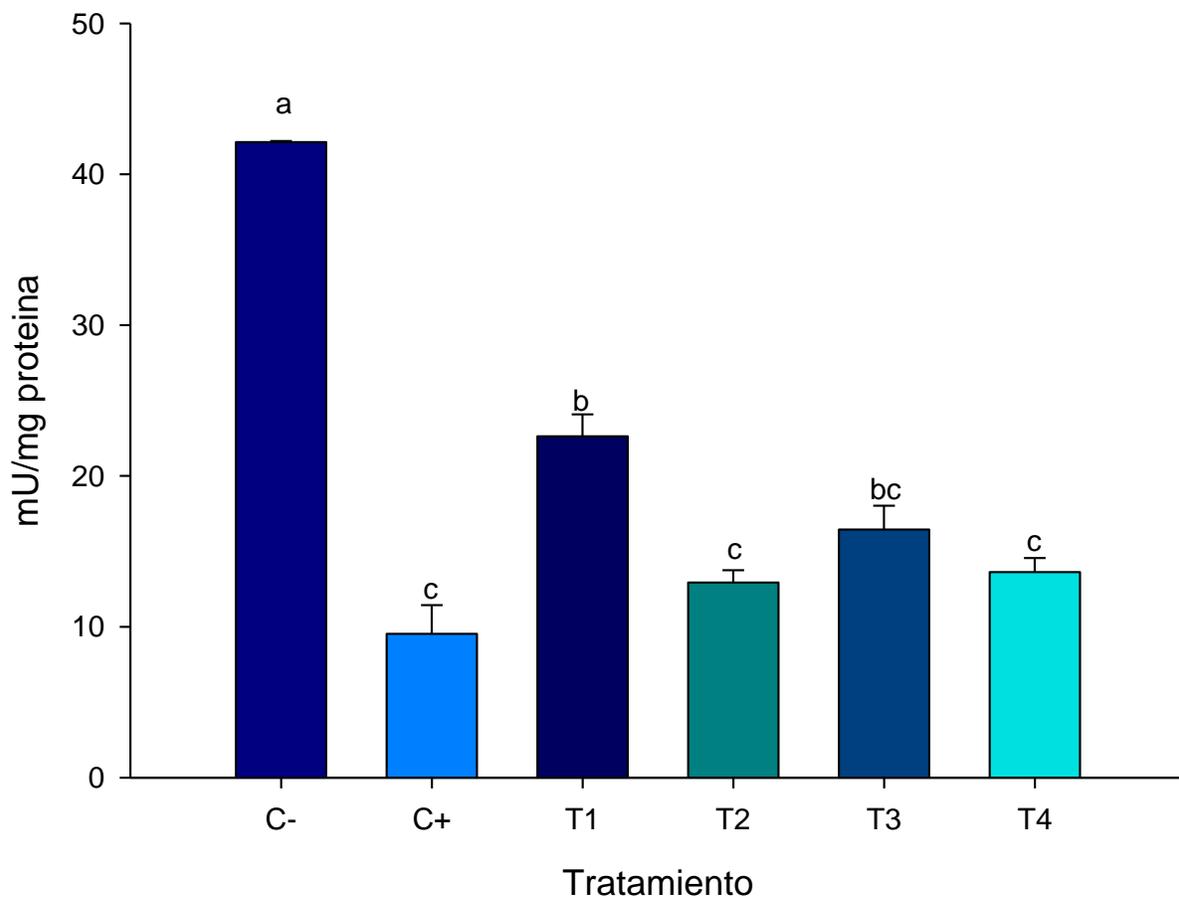


Figura 25. Actividad específica de leucina aminopeptidasa en intestino de tilapia *Oreochromis niloticus* Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc. Se muestran promedios y desviación estándar; n=15; diferentes siglas indican diferencias significativas ($P<0.001$).

3.3.5.- Fosfatasas alcalinas

Los niveles de actividad de la fosfatasa detectada en peces cultivados en tanques sin biofloc y con biofloc por un periodo de 8 semanas se muestran en la figura 26. El tratamiento T4 (adicionado con probiótico Eco-Aquablend® por 8 semanas) presento actividad de la fosfatasa de más del doble que el resto de los tratamientos, siendo significativamente mayor ($P=0.006$) que los otros tratamientos y no se encontraron diferencias significativas entre el resto de los tratamientos (Figura 26).

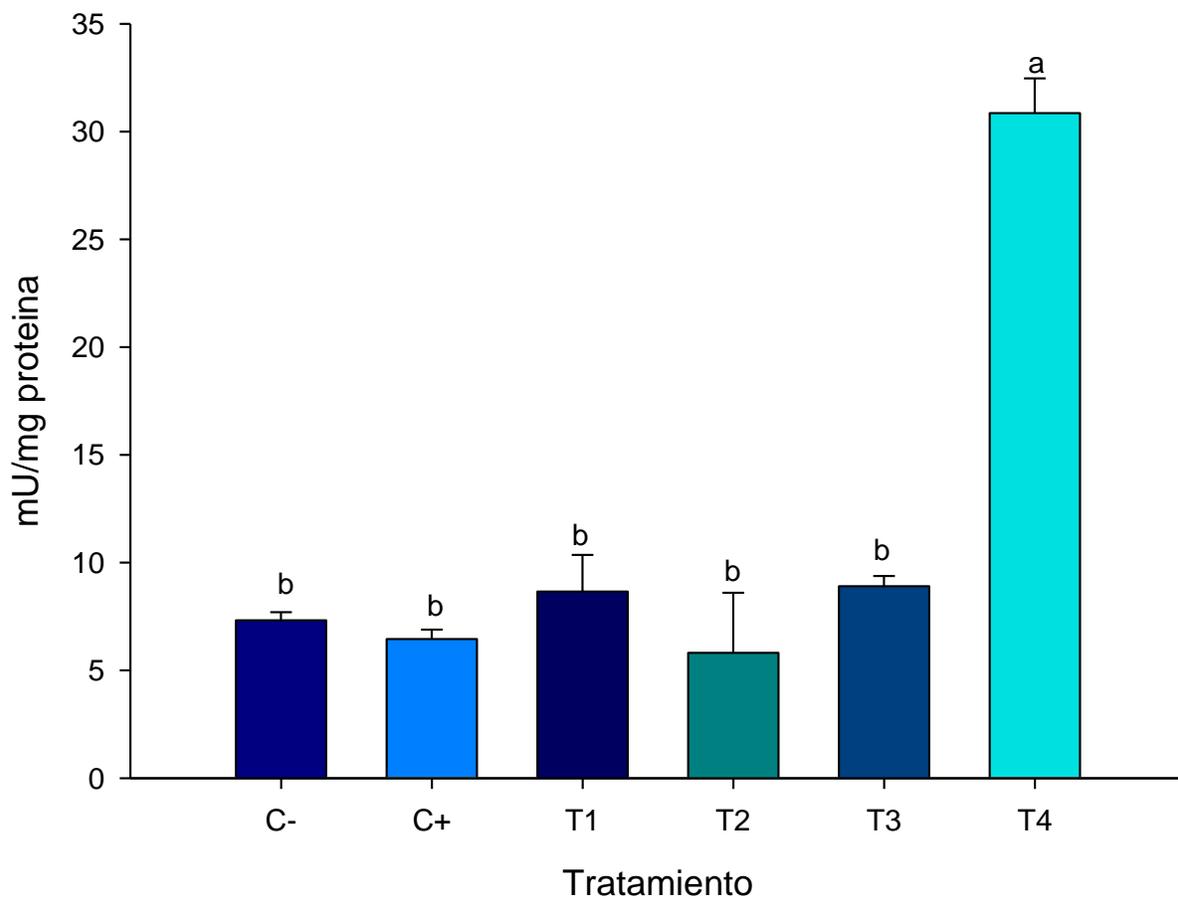


Figura 26. Actividad específica de fosfatasas en intestino de tilapia *Oreochromis niloticus* Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc. Se muestran promedios y desviación estándar; $n=15$; diferentes siglas indican diferencias significativas ($P=0.006$).

3.3.6.- α -amilasa

Los niveles de actividad de la α -amilasa presentes en los intestinos de los peces se reportan en la figura 27. Las tilapias bajo el tratamiento T4 (adicionado con probiótico Eco-Aquablend® por 8 semanas), presentaron niveles de actividad significativamente mayores ($P < 0.05$) que el resto de los tratamientos, sin encontrar diferencias significativas entre ellos.

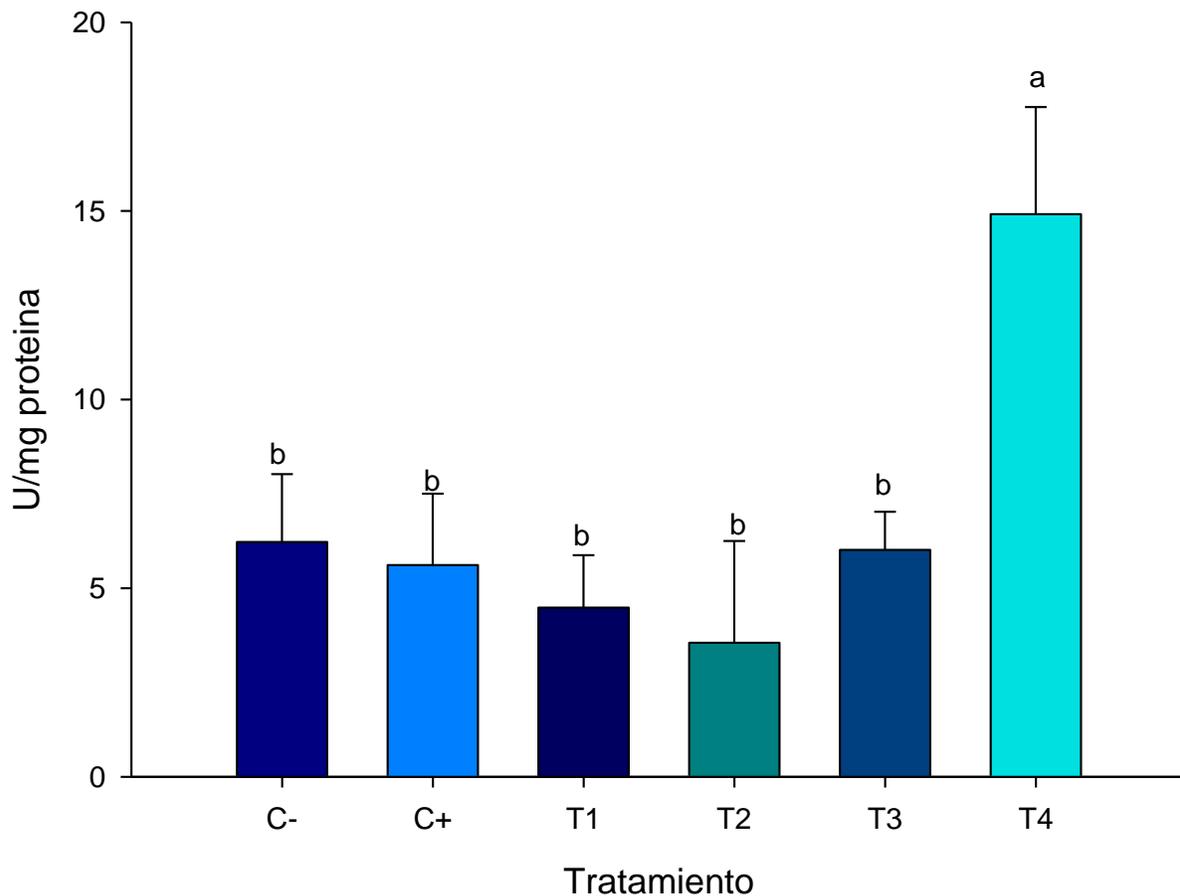


Figura 27. Actividad específica de α -Amilasa en intestino de tilapia *Oreochromis niloticus* Var. SPRING cultivada durante 8 semanas en biofloc. Se muestran promedios y desviación estándar; $n=15$; diferentes siglas indican diferencias significativas ($P=0.001$).

Capítulo 4. Discusión, conclusiones y recomendaciones

4.1. Calidad de agua

4.1.1. Amonio, nitritos y nitratos

Los sistemas tipo biofloc (BFT) están basados en la asimilación y transformación del nitrógeno inorgánico en biomasa bacteriana heterotrófica (Nootong y Pavasant, 2011). Los niveles de nitrógeno inorgánico (aportado por el alimento y por desechos de los organismos vivos) en biofloc puede llevarse a cabo mediante la reducción de proteína en el alimento o por la adición de una fuente externa de carbono manteniendo una relación C:N (Carbono: nitrógeno) adecuada (10:1, lo que indicaría que por cada gramo de nitrógeno, se requerirían 10 gramos de carbono) que pueda estimular el crecimiento de bacterias heterotróficas (Avnimelech, 1999; Azim y Little, 2008; Crab et al. 2007 y Manoel, et al. 2016). Para promover la remoción de amonio disuelto en el agua por medio de bacterias heterotróficas es necesario agregar una fuente de carbono (i.e., carbohidratos) con relación a la cantidad de alimento que se esté suministrado al sistema. Según Hargreaves (2013), por cada kilogramo de alimento con un contenido proteico entre 30 a 39% de proteína añadido al sistema se debe agregar entre 0.5 a 1 kg de alguna fuente de carbono como la azúcar. Fontenot et al. (2007) evaluaron el efecto de la relación C:N (i.e., 5:1, 10:1, 20:1 y 30:1) en la remoción del nitrógeno inorgánico en aguas residuales de un cultivo de camarón. Observaron que el máximo nivel de remoción se efectuaba con una relación de C:N de 10:1. En el presente trabajo se usó melaza como fuente externa de carbono y se fue modificando la relación C:N (de 20:1 a 10:1) a lo largo del experimento, manteniéndose siempre dentro del óptimo establecido por Avnimelech (1999) para mantener un crecimiento máximo de bacterias heterotróficas.

El amonio producido en los tanques de biofloc se da principalmente como bioproducto del catabolismo de las proteínas por los peces, la descomposición de materia orgánica como desechos de los peces, alimento no consumido y microbios muertos. El amonio puede ser consumido y asimilado rápidamente por microbios en el sistema añadiendo una fuente de carbono que estimule el crecimiento de bacterias heterotróficas. Sin embargo, estas bacterias suelen morir en poco tiempo liberando nitrógeno en forma de amoníaco al descomponerse. Es por esto que el amonio se recicla entre el amoníaco disuelto y los flóculos suspendidos, generando fluctuaciones constantes entre estos (Azim y Little, 2008). El uso de melaza como fuente de carbono presentó una secuenciación normal de un proceso de nitrificación

(amonio a nitritos y nitritos a nitratos) en sistemas no maduros. Sin embargo, la maduración del sistema fue mucho más rápida (cinco semanas) que aquella reportada por Nootong y Pavasant (2011), en la cual usaron almidón de tapioca y su sistema BFT tardo de 6-7 semanas en madurar. Esto sugiere que el uso de melaza es apropiado para madurar sistemas BFT con tilapia.

Los niveles de amonio en todos los tratamientos con biofloc y los inoculados con probióticos (C+, T1, T2, T3 y T4) presentaron un patrón similar. Al inicio de la fase experimental se registró un incremento significativo de amonio en todos los tratamientos. Este incremento generalmente se presenta en los sistemas utilizados con biofloc debido a que las bacterias presentes en el medio todavía no han alcanzado la densidad adecuada para la transformación de amonio en nitritos. Sin embargo, durante la segunda semana de cultivo las concentraciones de amonio disminuyeron. En contraste el tratamiento control negativo C- (sin biofloc ni probiótico y con recambios de agua del 20% diario) presentó la concentración de amonio más alta sobrepasando los 2 mg/l. Sin embargo, a lo largo del experimento se mantuvo debajo de 1 mg/l. Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por Luo et al. (2014), con *O. niloticus* en sistema de recirculación (RAS) y en biofloc (BFT), donde al día 20 del experimento se presentó el nivel más alto de amonio en los sistemas BFT, alcanzando concentraciones de 60 mg/l, mientras que en el sistema RAS apenas llegaron a 6 mg/l en el mismo tiempo. Un experimento similar realizado por Long et al. (2015) reportaron que a la primera semana de cultivo con *O. niloticus* en sistema BFT los niveles de amonio presentaron su concentración más alta (1.4 mg/l). Aun así, Luo et al. (2015) reportó concentraciones arriba de 100 mg/l en cultivo de perca jade (*Scortum barcoo*) sin causarle efectos negativos.

Este proceso se conoce como nitrificación y se presenta cuando los sistemas comienzan a “madurar” observándose que las concentraciones de amonio tienden a disminuir y empieza el proceso donde los nitritos aumentan. Este es un proceso de transformación del nitrógeno, en el cual el amonio es oxidado a nitritos y posteriormente a nitratos, durante este proceso se pierde un poco del nitrógeno disuelto en el sistema, ya que una parte se libera en forma de desecho gaseoso (Piedrahita, 2003). Generalmente, los organismos encargados de llevar a cabo el proceso de oxidación del nitrógeno amoniacal a nitritos son las bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus* (Avnimelech, 1999; Safari y Yosefian, 2006; Crab et al. 2007 y Nootong y Pavasant, 2011). Es común la presencia de nitritos en los sistemas intensivos, ya que este es un intermediario en la nitrificación, debido a que se transforma el NH_3 durante estos procesos (Siddiqui y Al-harbi, 1999).

Durante la primera semana de experimentación la concentración de nitritos en todos los tratamientos fue cercana a 0 mg/l. Sin embargo, a los 8 días del experimento, los niveles comenzaron a aumentar. Esto

concuerta con la reducción de amonio que se observó a lo largo de la segunda semana de experimentación. El pico más alto se dio alrededor del día 30 con una concentración cercana a los 80 mg/l de nitritos en el T2. Esta concentración es menor a la reportada en el trabajo de Luo et al. (2014) donde al día 20 de su experimento observo concentraciones de hasta 120 mg/l sin presentar efectos adversos para la tilapia *O. niloticus*. Posteriormente los niveles de nitrito en todos los sistemas descendieron drásticamente hasta alcanzar niveles cercanos a 0 mg/l, similar al reportado en otros trabajos (Avnimelech, 1999; Luo et al. 2014 y Rajkumar et al. 2015).

Posterior al proceso de nitrificación, donde se oxida el amonio a nitrito, comienza otro proceso llamado nitratación en el cual mayormente las bacterias autótrofas del género *Nitrobacter*, oxidan los nitritos en nitratos (Nootong y Pavasant, 2011). Los nitratos pueden llegar a ser tóxicos a muy altas concentraciones, por ejemplo Rakocy (1989) menciona que entre 600 y 700 mg/l, el consumo de alimento en tilapias se ve reducido, sin embargo, en este estudio los valores se encontraron muy por debajo de estos límites.

Es importante mencionar que al final del experimento, el control negativo (C-) presento concentraciones de amonio y nitratos significativamente menores a los tratamientos con biofloc. Así mismo, en el caso de los nitritos, al final del experimento no se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos. Esto concuerda con los trabajos realizados por (Luo et al. 2014 y Sanchez, 2016), donde se comparó la efectividad de un sistema tipo biofloc con uno de recirculación, en los cuales, al final del experimento, ambos obtuvieron concentraciones de nitritos de 0 mg/l, lo cual indica que en este trabajo el biofloc tuvo un efecto positivo en la transformación del amonio en nitritos y posteriormente en nitratos.

Farzanfar (2006) menciona que hay una gran cantidad de reportes en los cuales se usan productos microbianos (i.e., probióticos) para aumentar la remoción de amonio en diversos tipos de cultivos. Sin embargo, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en la remoción de amonio entre los tratamientos con probióticos (T1, T2, T3 y T4) y el control positivo (C+, el cual no estaba adicionado con probióticos), lo que sugiere que los probióticos usados en el presente experimento, no tuvieron un efecto importante en la remoción de amonio.

4.1.2. Alcalinidad y pH

Es bien conocido que los sistemas que emplean la tecnología de biofloc (BFT) tienen una desventaja, ya que el nivel de alcalinidad tiende a disminuir naturalmente gracias a las bacterias, las cuales producen pequeñas concentraciones de ácido nítrico a través del proceso de nitrificación ya que las bacterias liberan iones de hidrogeno mientras transforman el amonio en nitratos. Es por la actividad bacteriana que los sistemas biofloc tienden a acidificarse con el tiempo. Todos los procesos de control de amonio en el sistema BFT consumen alcalinidad, y es el proceso de nitrificación la causa de la mayor pérdida de alcalinidad (Hargreaves, 2013). Por esto, fue necesario añadir carbonato de calcio al sistema una vez por semana tratando de mantener niveles adecuados de alcalinidad (150 mg/l) y mantener el crecimiento bacteriano sin perder la capacidad amortiguadora del sistema. En el presente experimento, el nivel de alcalinidad nunca bajo de los 50 mg/l ni sobrepaso los 200 mg/l. Por su parte, Azim y Little (2008) observaron concentraciones de alcalinidad entre 8-250 mg/l sin presentar efectos negativos para la producción de tilapia.

Debido a la adición constante de carbonato de calcio, los niveles de pH en los sistemas fueron adecuados para el cultivo de tilapia (pH entre 7 y 8). Se encontraron valores de pH significativamente más bajos en el T4, probablemente asociado a la alta biomasa de peces en este tratamiento, lo cual derivó en mayor adición de alimento que en el resto de los tratamientos, por lo que hubo una mayor tasa metabólica y mayor producción de biofloc, resultando un sistema más ácido ya que al aumentar el metabolismo en los peces y bacterias, hay mayor consumo de oxígeno, por lo que se libera mayor cantidad de CO₂ (compuesto ácido), así mismo hay otros factores que pueden influenciar en la acidificación del sistema, como son la temperatura y la producción de microalgas. El C- presentó el nivel de pH más alto, siendo significativamente mayor al T4, pero no con el resto de los tratamientos. Su alto nivel de pH puede atribuirse a la ausencia de biofloc en el sistema y a la baja biomasa de peces.

4.1.3. Flóculos

En los sistemas BFT los sólidos derivados de los desechos orgánicos de los peces y microorganismos, así como del alimento suministrado, tienden a acumularse y los niveles de estos incrementan por la alimentación y por la adición de fuentes de carbono llegando a alcanzar concentraciones peligrosas para los peces, las cuales oscilan entre 2,000 a 3,000 mg/l (Hargreaves, 2013). Concentraciones de flóculos entre 500 y 1,000 mg/l son recomendadas para un manejo eficientemente en estos sistemas. Avnimelech (2007)

recomienda concentraciones entre 200 a 300 mg/l para un buen funcionamiento del sistema y control adecuado del amonio sin tener una aireación del agua excesiva. Por su parte, Wang et al. (2015) encontraron que concentraciones entre 100 a 300 mg/l de flóculos no presentaron efectos adversos en el crecimiento de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Así mismo, Avnimelech y Kochba (2009) recomiendan concentraciones entre 30-50 mg/L para el cultivo de peces. En el presente experimento se intentó mantener los niveles de flóculos entre 50 y 100 ml/L por lo que se drenó el 5% del volumen total de los tanques de cada tratamiento una vez por semana.

Al final del experimento los tratamientos que presentaron mayor cantidad de flóculos fueron el T4 y el C+ con concentraciones cercanas a los 80 ml/L, probablemente debido a que la biomasa final en estos tanques fue significativamente mayor, por lo tanto, se necesitaba una mayor adición de alimento y de melaza. Para tener un mayor control de los niveles de flóculos, hubiera sido recomendable hacer adiciones de carbonato de calcio más frecuentemente, ya que los microorganismos adheridos a los flóculos usan este compuesto para aumentar en biomasa. Avnimelech (1999) y Rajkumar et al. (2015) mencionan que la manipulación de la relación carbono: nitrógeno (C:N) es un método potente, económico y práctico para controlar los sistemas en acuicultura. En el presente experimento la relación C:N se fue ajustando de 20:1 al principio del experimento a 10:1 al final del mismo. Este ajuste fue adecuado para mantener la calidad del agua y para no tener un exceso de flóculos que pudieran llegar a afectar la concentración de oxígeno disuelto o a los mismos organismos en el sistema.

4.1.4 Temperatura y oxígeno disuelto.

La temperatura recomendada para el crecimiento óptimo de la tilapia es de 24 a 30°C (Rakocy, 1989). En el presente experimento todos los sistemas al estar expuestos a la intemperie se comportaron de la misma manera sin presentar diferencias significativas entre ellos. La temperatura promedio varió de 32°C en septiembre a 26°C en noviembre.

Así mismo los niveles de oxígeno presentes en los sistemas siempre estuvieron dentro del rango óptimo para el crecimiento de la tilapia (>4.5 mg/l) (Barreto-curriel et al. 2015) ya que para manejar un sistema tipo BFT es necesario mantener una aireación constante abundante para impedir la sedimentación de los flóculos.

4.2. Parámetros biológicos

4.2.1. Crecimiento

El crecimiento de los peces, su composición corporal y conversión alimenticia varían con la especie, la genética, sexo, edad, la calidad de las dietas y las condiciones ambientales, entre otros factores.

Estudios previos han demostrado que el uso de la tecnología biofloc (BFT) contribuye substancialmente al crecimiento y producción de tilapia del Nilo. Esta especie omnívora es capaz de ingerir las partículas de alimento formadas por algas y bacterias producidas *in situ* las cuales promueven la actividad enzimática digestiva, por consecuencia mejoran el crecimiento y modifican la composición corporal de las tilapias (Long et al. 2015; Yuan et al. 2010; Azim y Little, 2008; Little et al. 2008; Avnimelech, 2007 y Beveridge y Baird, 2000). Así mismo se han registrado múltiples trabajos que muestran como el uso de probióticos promueve el crecimiento en peces, mejora la asimilación de nutrientes y la calidad del agua (Hamdan y Carmen, 2016; Zhang et al. 2016; Sanchez, 2016; Long et al. 2015; Hernández, 2014; Monroy et al. 2012; Welker y Lim, 2011; Farzanfar, 2006; Ziaei-nejad et al. 2006 y Günther et al. 2004).

En el presente trabajo se evaluaron dos probióticos comerciales, Eco-aquaprotect® y Eco-aquablend®, los cuales están enriquecidos con enzimas digestivas (proteasa, amilasa y celulasa), bacterias (*Bacillus*, *Brevibacillus* y *Thiobacillus*) y levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El proveedor menciona que el probiótico Eco-aquablend® contiene *Bacillus subtilis*, *megaterium*, *licheniformis*, *polymixa*; *Brevibacillus laterosporus* y *Thiobacillus novelus*. Mesalhy et al. (2008) analizaron los efectos de combinar *B. subtilis* con *Lactobacillus acidophilus* en el alimento formulado, observaron que mejora el crecimiento y la salud de Tilapia del Nilo. Cutting (2011) hizo una revisión en la que muestra el uso de especies de *Bacillus* como probióticos, su seguridad, modo de empleo y aplicaciones comerciales, entre ellas menciona a *B. subtilis*, *megaterium*, *licheniformis* y *polymixa*, las cuales al ser usadas como suplemento alimenticio pueden estimular la respuesta inmune, actividad antimicrobiana y exclusión por competencia.

El Eco-aquaprotect® contiene *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymixa*, *Thiobacillus novelus* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Así mismo Wang et al. (2008) describe el uso en acuicultura de bacterias del genero de los Bacilos, mencionando los beneficios de incluirlos como suplementos, entre estos, se encuentra el valor agregado al alimento, contribución enzimática a la digestión, inhibición de microorganismos patogénicos, actividad antimutagénica y anticancerígena, factores promotores del crecimiento e incremento en la respuesta inmune. Por último la bacteria *Thiobacillus novelus* ha sido reportada por Chung et al.(2008) por tener la capacidad de remover el H₂S (Ácido Sulhídrico) del agua, el

cual es un compuesto tóxico para las especies acuáticas. Así mismo, la bacteria *Brevibacillus laterosporus* tiene función algicida (Jia et al. 2014). Debido a esto, estas últimas bacterias se usan como aditivos para bio-remediar cuerpos de agua.

En el presente estudio, el mayor crecimiento por individuo de *O. niloticus* Var SPRING cultivada en sistemas BFT adicionado con diferentes productos probióticos se presentó en el T4 utilizando el probiótico Aquablend. La estimación de la ganancia en peso promedio fue de 1.61g por día por pez con TCE de 3.58, valor menor que los reportados por Cedano et al. (2013) y Rakocy et al. (2008) de 4.5 y 3.2 g/día respectivamente. Sin embargo, estos autores realizaron sus estudios en sistemas tipo BFT con peso inicial alrededor de los 110 g usando alimento con 24% con TCE de 1.1 (Cedano et al. 2013) y 32% y TCE de 0.8 (Rakocy et al. 2008) de proteína durante un periodo de cultivo de 26 semanas a comparación de este estudio donde fueron 8 semanas con un peso inicial alrededor de 12 g y un alimento con 32% de proteína.

Los resultados del presente estudio indican que el biofloc tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento, debido a que el C- presentó una ganancia en peso menor a la mitad del alcanzado por el resto de los tratamientos bajo condiciones BFT. Sin embargo, los peces del T4 fueron los que alcanzaron mayor incremento en peso, probablemente asociado a la constante adición del probiótico el que contenía levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que los tratamientos (T1 y T2) que contenían bacterias del género *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Thiobacillus* pero no levadura, alcanzaron pesos significativamente menores comparados al T4. Así mismo el hecho de que los peces del T3 presentaran un menor crecimiento con respecto al T4, indica que es necesaria la adición diaria de este probiótico para generar el efecto positivo de este probiótico en juveniles de tilapia. En otros trabajos realizados con alimento formulado adicionado con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y evaluados en tilapia (Lara-Flores et al.2010; Abdel-Tawwab et al. 2008 y Lara-Flores et al. 2003), se demostró que los juveniles de tilapia presentaron mayor aumento en la tasa de crecimiento, factor de conversión alimenticia, deposición de proteína en el cuerpo, parámetros bioquímicos (niveles de glucosa, albumina, globulina, lípidos totales, proteínas totales, hematocrito, conteo de glóbulos rojos y hemoglobina) y actividad de fosfatasa alcalina. Lo cual indico que esta levadura funciona como aditivo estimulante del crecimiento en cultivo de tilapia.

4.2.2. Índices de eficiencia alimenticia

El factor de conversión alimenticia (FCA) es una medida de la eficiencia en la utilización del alimento y se calcula con el peso ganado por los peces durante el bioensayo por la cantidad de alimento suministrado (Epp et al. 2002). Un FCA cerca o menor que 1 nos indica que el alimento suministrado es nutricionalmente adecuado para el organismo y está siendo utilizado eficientemente. Esto significa que por cada kilogramo de alimento suministrado el organismo está creciendo 1 kilogramo en peso (Manoel et al. 2016). El FCA más bajo en este experimento se presentó en el C+, seguido por el T3, T1, T4, T2 y C-. Se pudo observar que la adición de biofloc al sistema promovió un mejor rendimiento del alimento suministrado. Sin embargo, no hubo un efecto significativo entre el C+ y el resto de los tratamientos (T1, T2, T3 y T4) derivado de la adición de probióticos a los sistemas BFT. Aun así, los valores de FCA son menores que los encontrados en otros trabajos realizados en sistemas RAS y BFT por Luo et al. (2014) y Avnimelech (1999) con tilapia del Nilo (1.47 en RAS y 1.2 en BFT) en los cuales el peso inicial fue de 24.17g por 87 días alimentados al 2% de la biomasa total. Lo cual indica que el biofloc cumplió su función de alimentar a las tilapias y aumentar la asimilación del alimento. Así mismo, trabajos relacionados al uso de probióticos para crecimiento de tilapia, han demostrado que la adición de levaduras y bacterias reduce el FCA (de 3.2 a 1.01) considerablemente (Lara-flores et al. 2010). Avnimelech (1999) demostró que reduciendo el porcentaje de proteína en el alimento de 30% a 20% y aumentando la relación C:N de 11.1:1 a 16.6:1 redujo el FCA considerablemente de 2.62 a 2.17. Consecuentemente aumento el TEP de 2.18 a 4.35 indicando que el uso de la proteína por parte de los peces fue dos veces mayor. Este incremento se debe a que los microorganismos reciclaron la proteína y esta fue usada ingerida dos veces por los peces primero como alimento y por segunda vez como masa microbiana.

La tasa de eficiencia proteica (TEP) es un indicador de la calidad de la proteína suministrada en el alimento (Moreno et al. 2013). Se expresa como los gramos de peso ganado por gramo de proteína consumida. En el caso de este experimento el rendimiento más alto de TEP fue en el C+ (2.83), sin presentar diferencias significativas con el resto de los tratamientos con biofloc, pero si con el C- (sistema con recambios de agua del 20% del volumen total diario). Todos los tratamientos con biofloc obtuvieron un rendimiento mayor que el registrado por Rajkumar et al. (2015) con postlarva (0.15g) de camarón blanco (*L. vannamei*) en biofloc por 60 días con alimento formulado (34.6% proteína) con TEP de 2.59 y Long et al. (2015) de 2.59 en cultivo de juveniles (50g) de tilapia del Nilo genéticamente modificada (GIFT) en biofloc alimentados con 46% de inclusión de proteína. La TEP de los tratamientos con biofloc (C+, T1 y T3) fueron significativamente mayores que la TEP del C- mientras que el T2 y T4 no presentaron diferencias significativas con ningún tratamiento. Este mejoramiento en la utilización de la proteína probablemente

esté relacionado a la presencia de biofloc en estos sistemas. Los microorganismos presentes en los flóculos típicamente contienen 45% de proteína cruda (Rajkumar et al. 2015). Sin embargo, este porcentaje puede variar un poco dependiendo de la composición taxonómica presente en el biofloc. Es muy probable que las tilapias se alimenten parcialmente de este biofloc y por lo tanto mejore la TEP en los sistemas BFR.

La TCE es un valor que nos indica que tanto más rápido crecieron los peces de un tratamiento contra otro tratamiento (i.e., dieta, temperatura, densidad). Lo importante de la TCE es que nos permite hacer comparaciones entre peces de tamaño diferente asumiendo que hubo un crecimiento exponencial.

En el presente estudio se utilizó una dieta de 32% de proteína, alcanzando la mayor TCE (3.58%) en el T4 y la menor (2.56%) en el C- sin encontrar diferencias significativas entre los tratamientos con biofloc (C+, T1, T2, T3 y T4). Jauncey (1982) evaluó diferentes niveles de inclusión de proteína en la dieta para juveniles de tilapia (*Sarotherodon mossambicus*) con peso inicial de 1.89 g y reporto la mejor TCE con la dieta de 32% de proteína alcanzando una tasa de crecimiento del 3.82% por día, usando una tasa de alimentación del 5% de la biomasa total durante un periodo experimental de 40 días. Así mismo, observó que los niveles mayores de inclusión de proteína en la dieta tendieron a reducir la TCE para esta especie. Por su parte Long et al. (2015) evaluaron el efecto del biofloc en el crecimiento de tilapia genéticamente modificada (*Oreochromis niloticus*) por 8 semanas usando dietas de 46% de proteína utilizando tasas de alimentación del 5% al 3% y observando TCE de 2.04% por día, lo que podría indicar que el biofloc adicionado con el probiótico Aquablend® por 8 semanas promueve el crecimiento de los peces.

4.2.3. Hematocrito (Hc)

El valor de Hc es un indicador del porcentaje de glóbulos rojos en la sangre y puede variar debido a diferentes factores como la talla, edad y sexo, estado de salud, nutrición deficiente y parámetros fisicoquímicos desfavorables presentes en el medio en que se encuentra el organismo (Brischoux et al. 2011). La disminución del Hc puede referirse a problemas de salud (anemia) en la mayor parte de los organismos y puede relacionarse con estrés entre otros factores (Cuervo et al. 2010). En el presente estudio, los valores de Hc encontrados para la tilapia en todos los tratamientos fluctuaron entre el 30% y 38%. Esto valores de Hc se encuentran dentro del intervalo considerado como normal o apto para las tilapias bajo condiciones de cultivo (i.e., entre 30-40%) (Bittencourt et al. 2003). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con biofloc (C+, T1, T2, T3 y T4), si fue más elevado el valor

de Hc en los tratamientos T3 y T4, lo cual podría sugerir que la adición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* promovió la salud de los organismos.

Apún et al. (2015) obtuvo un valor de Hc del 28% con la suplementación diaria de una mezcla de probióticos, lo cual es un valor mucho menor a los obtenidos en el presente estudio para los tratamientos adicionados con probióticos. Por su parte Al-dohail et al. (2009) obtuvo un valor de 30% con la adición de *Lactobacillus acidophilus* en la dieta del bagre africano (*Clarias gariepinus*). Por otra parte Hassaan (2014) evaluó la inclusión de *Bacillus licheniformis* en la dieta para tilapias, obteniendo valores menores (i.e, 15 a 17%) a los normales o aptos para esta especie y mucho más bajos que los obtenidos en el presente estudio (32 a 38%) en los tratamientos que fueron suplementados con biofloc, por lo que se puede suponer que el biofloc mantiene el estado de la salud en los peces y se necesitan más estudios sobre la contribución de los probióticos en biofloc sobre los parámetros hematológicos de las tilapias.

4.2.4. Índice hepatosomático (IHS)

El índice hepatosomático (HSI) no indica la relación del peso del hígado en proporción con el peso total del organismo. Entre mayor el hígado mayor el índice. En algunos peces cuando la energía en la dieta es alta, los organismos almacenan este exceso de energía como lípidos o glucógeno. Estas reservas energéticas pueden ser movilizadas para hacer frente a periodos de ausencia de alimento o para etapas reproductivas, donde la mayor cantidad de la energía almacenada será utilizada para la producción de gametos (González y Oyarzun, 2002). El índice hepatosomático es especie-específico y su valor se relaciona con el almacenamiento de grasa y/o glucógeno en el hígado con relación al peso del cuerpo, en peces óseos el porcentaje del IHS, por lo general, es entre 1 y 2 %. (González, 2011).

En el presente estudio, el índice hepatosomático más alto se observó en el T2 (2.24) mientras que el menor en el C- (1.56). Dentro de los tratamientos con biofloc (C+, T1, T2, T3 y T4) no se encontraron diferencias significativas lo cual indica que la adición de probióticos al biofloc no generó un efecto en este parámetro. Sin embargo, si se observó un efecto positivo al comparar el control negativo (C-) con el resto de los tratamientos. Soliman et al. (1986) cultivaron juveniles de tilapia del Nilo por 8 semanas modificando el tipo de ácido ascórbico y registraron rangos de índices hepatosomáticos entre 1.73 y 2.76. Así mismo, Yuangsoi et al. (2014), reportaron índices hepatosomáticos de 2.36 a 2.61 en bagre bocourti (*Pangasius bocourti*) sustituyendo la proteína de soya por proteína de moringa en el alimento. Ambos estudios no presentaron enfermedades derivadas del hígado. Por lo que se puede deducir que IHS en este trabajo no

alcanzo niveles peligrosos para esta especie. Sin embargo, para tener un aproximado más certero sobre el estado de salud, sería necesario realizar trabajos de análisis proximal del hígado.

4.3. Actividad enzimática

Uno de los retos en la acuicultura es reducir el uso de proteína de fuente animal en las dietas formuladas y/o aumentar la capacidad de digestión, absorción y asimilación de estas proteínas por los organismos a cultivar. La digestión es el proceso de solubilizar y degradar nutrientes en sus componentes más básicos (i.e., monómeros) para que puedan ser transportados a través de las paredes intestinales para los procesos fisiológicos y metabólicos vitales. Por lo que es de gran importancia realizar estudios sobre la actividad de enzimas digestivas como proteasas, amilasas, fosfatasas y lipasas, entre otras.

Las enzimas son catalizadores biológicos de origen proteico que aumentan la velocidad de una reacción sin que esta afecte en si a la misma enzima (Lehninger, 1984). La caracterización de las enzimas digestivas, su funcionalidad, adaptaciones a diferentes tipos de alimentos y las características de estas son de gran importancia para comprender la capacidad digestiva de especies acuícolas cultivables ya que estos estudios pueden aportar información acerca del estado de salud de los organismos, su capacidad para digerir alimentos, así como el efecto de una dieta formulada sobre una especie (Moyano, 2006).

Previamente se ha documentados que el biofloc es una fuente rica en compuestos bioactivos tales como carotenoides, clorofilas, fitoesteroles, bromofenoles, amino azucres (Ju et al. 2008) y compuestos anti bacterianos (Crab et al. 2010). Esto sugiere que los compuestos microbianos, factores de crecimiento desconocidos y organismos probióticos como *Bacillus*, *Lactobacillus* presentes en el biofloc podrían mejorar la digestión del alimento por medio de producción de enzimas exógenas. Anand et al. (2014) observaron el efecto de enzimas digestivas (amilasa, proteasa, lipasa y celulasa) derivado de la adición de varias concentraciones de biofloc en la dieta de *Penaeus monodon* y descubrieron que suplementar con un 4 al 8% con biofloc al alimento formulado suministrado, incrementaba la actividad de estas enzimas en el páncreas y en el intestino. Sin embargo, Caldini et al (2015) evaluaron la diferencia entre suministrar el biofloc en la dieta de tilapia del Nilo y el cultivar a esta especie en un sistema tipo BFT (C:N = 1:15), y observaron que los organismos presentaron crecimiento significativamente mayor en sistemas tipo BFT que en un sistema abierto con alimento formulado adicionado con biofloc. Esto indica que el biofloc generado *in situ* promueve la digestibilidad de las proteínas a través del incremento en la actividad enzimática de los organismos cultivados (Xu y Pan, 2012). Así mismo, en el trabajo realizado por Lara-flores

et al. (2010) se demuestra que la adición de probióticos de origen bacteriano y de levaduras promueven la actividad enzimática y el crecimiento en el cultivo de tilapia del Nilo.

4.3.1. Proteasas alcalinas totales, tripsina y quimotripsina

Las proteasas son enzimas que activan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas para así liberar los aminoácidos (estructuras primarias de la proteína) presentes (Pérez et al. 2003). En el presente trabajo se evaluaron las proteasas alcalinas totales en tilapia del Nilo, estas enzimas proteolíticas son las que trabajan en el intestino (pH alcalino) y están implicadas en la digestión de las proteínas en esta región del sistema digestivo (Moyano, 2006). Dentro de las proteasas alcalinas hay una gran variedad de proteasas como la tripsina y quimotripsina entre otras, Sin embargo, estas dos últimas son las más estudiadas debido a su fuerte participación en la digestión de las proteínas. Claramente no son las únicas, ya que existen muchas otras involucradas en la digestión alcalina; sin embargo, son pocos los estudios en peces que han cuantificado adecuadamente la participación relativa de las enzimas alcalinas.

La tripsina es una endopeptidasa pancreática que hidroliza los enlaces peptídicos constituidos por lisina y arginina de las proteínas. Se activa en el intestino cuando su zimógeno (tripsinogeno) es producido por el páncreas y activado en el lumen del intestino por la enteroquinasa presente en la membrana de los enterocitos (Cohen et al. 1981). Esta a su vez, se encarga de la activación del resto de zimógenos pancreáticos (quimotripsinógeno, procarboxipeptidasa A y B y proelastasa, entre otros). Por lo tanto, evaluar su actividad da un punto de referencia para estimar la importancia relativa de las diferentes enzimas digestivas alcalinas (Bezerra et al. 2005).

La utilización de probióticos en la maduración de cultivos en biofloc ha servido como promotores de crecimiento y para mejorar la digestión de los nutrientes de los organismos en cultivo (Rivas-Vega et al. 2012; Padmavathi et al. 2012; Cedano et al. 2013; Mohamed et al. 2013; Daniel y Nageswari, 2017), así mismo, se ha evidenciado que el biofloc juega un papel importante en la estimulación de enzimas digestivas (Moss et al. 2001; Xu et al. 2012). Yanbo y Zirong (2006) realizaron un estudio en carpa común (*Cyprinus carpio*) en el cual evaluaron el efecto de probióticos a base de bacterias *Bacillus* sp. en la actividad de enzimas digestivas intestinales. Descubrieron que la adición de bacterias *Bacillus* sp. incremento significativamente la actividad enzimática de proteasas, amilasas y lipasas, mejorando de esta forma la digestibilidad del alimento por las carpas. Caso similar a lo que ocurrió en el presente estudio, donde los tratamientos adicionados con probióticos presentaron niveles mayores de proteasas. Sin

embargo, la actividad de amilasas solo aumento en el T4, el cual fue adicionado con el probiótico Aquablend®, más adelante (sección 5.6.4) se hace una revisión más a profundidad de porque se comportó de esta manera la actividad de amilasas.

Xu y Pan (2012), en un estudio realizado con camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) observaron un incremento significativo en la actividad de las enzimas digestivas y un mejor crecimiento al ser cultivados en sistemas de biofloc. Este mismo efecto se ha observado en peces y crustáceos al ser alimentados con probióticos y microalgas como suplemento de la dieta. La presencia de componentes microbianos en la dieta complementada con biofloc con enzimas exógenas (enzimas presentes en los probióticos: celulasa, amilasa y proteasa) podría haber estimulado la producción de enzimas en las tilapias del presente estudio como ha sucedido en estudios previos con camarones (Anand et al. 2014)

El mejor crecimiento obtenido en el presente estudio fue para las tilapias bajo el tratamiento T4 y la actividad de la tripsina y quimotripsina fue significativamente mayor en este tratamiento. Posiblemente esta mayor actividad enzimática ayudo a una mejor digestión y absorción de las proteínas presentes en el alimento y el biofloc. Por su parte la baja actividad de proteasas alcalinas en el T3 sugiere que los microorganismos presentes en el probiótico Eco-aquablend® no mantuvieron una colonización del sistema digestivo y permanencia dentro del intestino ya que solo fue adicionado por 4 semanas La baja actividad de las proteasas alcalinas en el T3 podría estar explicar el menor crecimiento de las tilapias en este tratamiento. Sin embargo, se observa que el uso de probióticos de manera constante si aumenta considerablemente la actividad de proteasas alcalinas total.

4.3.2. Leucina aminopeptidasa

Las leucinas aminopeptidasas (LAP) son enzimas proteolíticas que catalizan la hidrólisis de los restos aminoacídicos en el extremo amino de los péptidos y proteínas y están presentes en los bordes de cepillo intestinal (Tengjaroenkul et al. 2000). Las LAP no solo desempeñan un papel importante en el mantenimiento del balance del nitrógeno, energía para el metabolismo, concentración de glucosa en la sangre, producción de hormonas de crecimiento y concentración de hemoglobina, sino que además promueve la síntesis de proteínas (Norton y Layman, 2006; Abidi y Khan, 2007), por lo que una deficiencia de esta enzima en el organismo, podría generar malfuncionamiento metabólico y reducir el crecimiento en los organismos (Fernstrom, 2005; Kiron, 2012), entre ellas la tilapia del Nilo (Gan et al. 2016).

En el presente estudio, la actividad de la enzima leucina aminopeptidasa, se vio directamente afectada por el uso de biofloc ya que todos los tratamientos en sistema biofloc (T1, T2, T3 y T4), así como el control positivo (C+) presentaron niveles de actividad menores que el control negativo (C-).

Comúnmente se relaciona el aumento en peso con una mayor actividad de la enzima LAP (entre otras) sin embargo en el caso del presente estudio, se puede observar que los tratamientos con biofloc, los cuales presentaron mayor crecimiento, también presentaron la menor actividad de la enzima LAP. Ferreira et al. (2016) evaluaron la actividad de diferentes enzimas (entre ellas LAP) en cultivo por 90 días juveniles de tilapia del Nilo (87.61 ± 1.52 g) en sistema de cajas y en sistema de estanque, descubrieron que las tilapias en sistema de cajas presentaron mayor actividad para la enzima LAP que el cultivo en estanque. Sin embargo, la actividad de esta enzima se redujo considerablemente a partir de los 63 días de cultivo. Esto quiere decir que los niveles de actividad enzimática pueden variar significativamente entre sistemas de cultivo y podría explicar en parte, la baja actividad de LAP en los tratamientos con biofloc (C+, T1, T2, T3 y T4).

Así mismo, la digestibilidad fisiológica está regulada (en parte) por ritmos circadianos, pero existen pocas evidencias en peces teleósteos (Lazado et al. 2017) y mucho menos en cultivo de biofloc. Los ritmos circadianos están presentes en todas las formas de vida, lo que les permite adaptarse a cambios periódicos del medio ambiente. Este mecanismo evolutivo regula los ritmos biológicos y de comportamiento, lo cual provee a los organismos con la capacidad de programar procesos biológicos para que ocurran en un momento óptimo del día o anualmente (Yerushalmi y Green, 2009). Los factores ambientales que más influyen en los ritmos circadianos en animales son los ciclos de luz y alimentación y estos parecen estar correlacionados (Montoya et al. 2010).

Lazado et al. (2017) evaluaron los ritmos circadianos de enzimas gástricas e intestinales en pámpano (*Trachinotus falcatus*) dividiéndolos en dos grupos, el primero fue alimentado en un esquema periódico (alimentación diaria a las 09:00 am) y el segundo grupo se alimentó de manera aleatoria (3-4 porciones diarias repartidas aleatoriamente), en este mismo experimento evaluaron la actividad enzimática a lo largo del día (12h luz, 12h oscuridad), alimentados con una ración del 2% diaria de la biomasa total del tanque. Observaron que los peces presentaron actividad enzimática anticipatoria a la alimentación. La actividad enzimática de LAP (entre otras) aumentaba en los peces que fueron alimentados en el esquema periódico, mientras que los organismos con alimentación aleatoria mantenían los niveles de LAP constantes. Así mismo, observaron que la variación en la actividad de la enzima LAP no presentaba variantes significativas a lo largo de todo el día, indicando que esta enzima no está correlacionada a un ciclo de luz y oscuridad,

sino que su actividad está directamente condicionada a la alimentación. Es posible que los niveles de LAP en el presente estudio, en los tratamientos con biofloc (C+, T1, T2, T3 y T4) se haya mantenido baja, debido al constante aporte de alimento proporcionado por el mismo biofloc, mientras que en el control negativo (-) los niveles hayan aumentado debido a que el muestreo se realizó en un momento donde la actividad enzimática de LAP presentaba los niveles más altos. Se recomienda realizar mayor investigación acerca de la respuesta de los ritmos circadianos en organismos cultivados en biofloc.

4.3.3. Fosfatasas alcalinas

Las fosfatasas alcalinas son las encargadas de catalizar la separación del fosforo inorgánico a partir del fosfato orgánico. Estas enzimas están presentes a lo largo del epitelio intestinal. Son encargadas, en parte, de transportar nutrientes como glucosa, proteínas, lípidos, agua e iones a través de la membrana (Dupuis et al. 1991).

Se ha demostrado que el uso de levaduras tanto en alimento formulado o adicionado directamente a los tanques de cultivo promueven el crecimiento, actividad enzimática, mejora la salud y ayuda a los organismos a reducir la incidencia de enfermedades (Gatesoupe, 2000; Tovar-Ramirez et al. 2008; Lara-flores et al. 2010). Por ejemplo, en el trabajo realizado por Lara-flores et al. (2010) se comparó el efecto de dos probióticos, uno enriquecido con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el segundo, una mezcla de las bacterias *Streptococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*. Ambos probióticos promovieron el crecimiento de la tilapia del Nilo, sin embargo, los tratamientos enriquecidos con levadura mostraron mejor crecimiento, este atribuido a la alta actividad de fosfatasa alcalina. Así mismo, Tovar-Ramirez et al. (2008) mencionan que las levaduras liberan constantemente pequeñas moléculas llamadas poliaminas, las cuales se encuentran en todos los materiales biológicos (Tabor y Tabor, 1984) y promueven el crecimiento, supervivencia y maduración del sistema digestivo.

En el presente trabajo se observó un efecto positivo en el crecimiento y actividad enzimática de fosfatasas alcalinas, al utilizar el probiótico Acuablend® por 8 semanas, ya que la actividad de la fosfatasa alcalina fue significativamente mayor que el resto de los tratamientos y lo que indica la importancia de la adición constante de este probiótico enriquecido con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para un mejor crecimiento.

En el trabajo realizado por Zhang et al. (2016), no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de fosfatasas alcalinas entre dos sistemas tipo biofloc adicionados uno con glucosa y el otro

con ácido Poli- β -hidroxibutirico por 60 días. Así mismo, en el presente estudio la adición del probiótico Acuaprotect® por 4 y 8 semanas (T1 y T2), la adición del probiótico Acuablend® por 4 semanas (T3) y el uso de puro biofloc (C+) no presentaron diferencia alguna con el control negativo (C-) en actividad enzimática de fosfatasas alcalinas.

4.3.4. α -amilasa

La enzima α -amilasa se encuentra principalmente en el páncreas, esta enzima es liberada al intestino donde digiere algunos carbohidratos a través de la hidrólisis de los enlaces alfa-glucosídicos de polisacáridos tales como el glucógeno y almidón, reduciéndolos y transformándolos en azúcares simples de fácil absorción (Nagase, 1964).

La actividad de estas enzimas en tilapia ha sido estudiada previamente (Fish, 1960; Sandoval-Muy et al. 2011; Barreto-Curiel et al. 2015; Gominho-Rosa et al. 2015; Ferreira et al. 2016), así como el efecto de los probióticos sobre los niveles de actividad de la α -amilasa en diferentes especies como *Penaeus monodon* (Anand et al. 2014), *Penaeus vanammei* (Mart et al., 2012), larvas de *Sparus aurata* (Suzer et al., 2008), *Cyprinus carpio* (Yanbo y Zirong, 2006), *Oreochromis niloticus* (Essa et al. 2010; Del'Duca et al. 2013; Hassaan, 2014) y el efecto del biofloc sobre la actividad enzimática de tilapias (Long et al., 2015). Sin embargo, el efecto combinado de probióticos y biofloc sobre la actividad enzimática de tilapia del Nilo, no ha sido reportado anteriormente.

En el presente estudio, la actividad específica de la α -amilasa fue significativamente mayor en el tratamiento inoculado con Aquablend® por 8 semanas (T4), el resto de los tratamientos (T1, T2 y T3) así como los controles (C- y C+) no presentaron diferencias significativas entre ellos pero si con el T4. Esto indica que como en el caso de la tripsina, quimiotripsina y las fosfatasas alcalinas, el uso de probióticos enriquecidos con la levadura *S. cerevisiae* por 8 semanas genera un efecto positivo en la actividad de α -amilasa. En contraste Essa et al. (2010), evaluando el efecto de cuatro grupos de probióticos previamente aislados de tilapias (*Oreochromis niloticus*) sanas. En su trabajo evaluó; *Bacillus subtilis* NIOFSD017, *Lactobacillus plantarum* NIOFSD018, una mezcla de ambas (*B. subtilis* NIOFSD017 y *L. plantarum* NIOFSD018) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* NIOFSD019. Como resultados observaron que la adición de *S. cerevisiae* no presentaba un efecto significativo en cuanto a la actividad de α -amilasa en el intestino comparado con el uso del probiótico *L. plantarum* NIOFSD018. Sin embargo, si fue significativamente mayor que el grupo control, el cual no había sido adicionado con probióticos. Por su

parte, Heidarieh et al. (2013) realizaron un estudio en el cual la evaluaron el uso de *S. cerevisiae* fermentada por 50 días en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). La levadura produjo un incremento significativo en la actividad específica de α -amilasa en intestino comparado con el grupo control (sin levadura).

Es interesante observar que ambos probióticos evaluados en el presente estudio (Aquablend® y Aquaprotect®) contienen enzimas como amilasa, celulasa y proteasas, las cuales en principio deberían ayudar a la digestión de los nutrientes. Sin embargo, no parecen generar un efecto en la actividad encontrada en los intestinos de las tilapias ya que el único efecto realmente positivo se presentó en el T4.

Capítulo 5. Conclusiones

5.1. Conclusiones generales

- Los probióticos Aquablend® y Aquaprotect® fueron efectivos en mantener la calidad de agua para un cultivo de tilapia en sistema tipo biofloc. Sin embargo, no presentaron diferencias significativas con el control positivo, por lo que evaluando el costo-beneficio, no se recomienda su uso para este efecto en particular. Sin embargo, en cuestión de crecimiento, el uso del probiótico Aquaprotect® adicionado constantemente si presento un efecto positivo en los juveniles de esta especie (*Oreochromis niloticus* Var SPRING).
- El modificar la relación carbono nitrógeno de 20:1 a 10:1 a lo largo del periodo de cultivo fue eficiente, ya que al principio ayudo a establecer un biofloc "sano" y activo, el cual ayudo a mantener los parámetros fisicoquímicos del agua estables y a la larga redujo el costo de adición de una fuente de carbono exógena y alimento formulado.
- El uso de biofloc adicionado con probióticos reduce el factor de conversión alimenticia, aumenta la tasa de eficiencia proteica, así como la tasa de crecimiento especifico y en este caso redujo los gastos de operación de \$243.47 (C-) a \$67.21 (T4) pesos mexicanos por kilogramo de biomasa ganada.
- El hematocrito y el índice hepatosomático se encontraron dentro de los rangos óptimos para el crecimiento de esta especie dentro de los tratamientos con biofloc (C+, T1, T2, T3 y T4) por lo que el uso de este tipo de sistema fue eficiente en el mantenimiento de la salud de esta especie.
- El uso de biofloc ayuda promueve el crecimiento de los organismos debido a que presentan una fuente de alimento de buena calidad constante y reduce la introducción de posibles patógenos debido a los escasos recambios de agua.
- El uso de probióticos en sistemas tipo biofloc, promueve la actividad de enzimas digestivas tanto endógenas como exógenas, por lo que los organismos cultivados son capaces de aprovechar mejor los nutrientes suministrados. Por lo tanto, se presenta un mejor crecimiento, mejor condición de salud y reducción de costos de alimento.
- El uso de probióticos y biofloc a nivel comercial es factible y recomendable debido a la disminución de costos por uso de agua y alimento formulado; aumenta la biomasa, reduce la incidencia de

patógenos, así como el impacto ambiental y los desechos presentan proteínas de alta calidad los cuales pueden ser reutilizados en piensos alimenticios.

5.2. Recomendaciones

- Mantener un control de la alcalinidad por medio de mediciones de alcalinidad más constantes y añadir carbonato de calcio en función del requerimiento del sistema.
- Evaluar la composición proximal de los organismos al inicio y al final del uso de biofloc con probióticos.
- Determinar la microflora presente en cada sistema de biofloc y evaluar si el uso de probióticos genera una colonización constante de estos sistemas.
- Evaluar la actividad de enzimas digestivas tipo lipasa y celulasa en biofloc inoculado con probióticos, tanto en tilapia como en otras especies.
- Inocular con probióticos previamente aislados de tilapias sanas para generar una colonización del sistema especie-específico.
- Determinar en qué etapa de desarrollo del organismo es más eficiente el uso de sistemas tipo biofloc adicionado con probióticos y el periodo exacto de adición de los probióticos para reducir costos y aumentar factores de condición.
- Inocular los sistemas en condiciones controladas para así reducir el efecto de variables ambientales como temperatura, incidencia de microorganismos por vía aérea y tratamiento del agua de entrada.
- Evaluar el efecto de la adición de biofloc madurado con probióticos en dietas formuladas en la actividad enzimática y crecimiento de varias especies.

Literatura citada

- Abdel-Tawwab, M., M. Abdel-Rahman, A., E. M. Ismael, N. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280, 185–189.
- Abidi, S. F., Khan, M. (2007). Dietary leucine requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton), 478–486. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01687.x>
- Al-dohail, M. A., Hashim, R., Aliyu-paiko, M. (2009). Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture research*, 40, 1642–1652. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02265.x>
- Anand, P. S. S., Kohli, M. P. S., Kumar, S., Sundaray, J. K., Roy, S. D., Venkateshwarlu, G., Pailan, G. H. (2014). Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 418-419, 108–115. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.051>
- Apun, Juan Pablo, Miranda, A. S., Luna-gonza, A., Sergio, F. (2009). Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture research*, 40, (2000), 887–894. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02172.x>
- Apún-molina, J. P., Santamaría-miranda, A., Luna-gonzález, A., Obregón, C., Sinaloa, U., Juan, B., Bátiz, D. D. (2015). Growth and metabolic responses of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in polyculture fed with potential probiotic microorganisms on different schedules. *Latin american journal of aquatic research*, 43(3), 435–445. <http://doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-5>
- Avnimelech, Y. (1999). Carbon/ nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227–235.
- Avnimelech, Y., Ritvo, G. (2003). Shrimp and fish pond soils : processes and management, 220, 549–567. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00641-5](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00641-5)
- Avnimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *aquaculture*. 264, 140–147. <http://doi.org/10.1016/j>
- Avnimelech, Y., Kochba, M. (2009). Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using 15N tracing. *Aquaculture*, 287(1-2), 163–168. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.009>

- Azim, M. E., Little, D. C. (2008). The bio-floc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, bio-floc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283, 29–35. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>
- Barreto-curiel, F., Durazo, E., Viana, M. T. (2015). Crecimiento, excreción de amonio y consumo de oxígeno de la tilapia híbrida roja (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis aureus*) cultivada en agua de mar y en agua dulce. *Ciencias Marinas*, 41(3), 247–254. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v41i3.2526>
- Beveridge, M. C. M., Baird, D. J. (2000). Diet, feeding and digestive physiology. In M. C. M. Beveridge & B. J. McAndrew (Eds.), *Tilapias: Biology and Exploitation* (pp. 59–87). Dordrecht: Springer Netherlands. http://doi.org/10.1007/978-94-011-4008-9_3
- Bezerra, R. S., Lins, E. J. F., Alencar, R. B., Paiva, M. G., Chaves, M. E. C., Coelho, L. C. B. B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, 40, 1829–1834. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.066>
- Bittencourt, R., Molinari, L. M., Oliveira, D. De, Pedroso, R. B., Nakamura, C. V., Ueda-nakamura, T. (2003). Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 25(2), 385–389.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brischoux, F., Gartner, G. E. A., Garland Jr, T., Bonnet, X. (2011). Is Aquatic Life Correlated with an Increased Hematocrit in Snakes? *PLOS ONE*, 6(2), 1–6. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017077>
- Caldini, N. N., Cavalcante, D. D. H., Roberto, P., Rocha, N. (2015). Feeding Nile tilapia with artificial diets and dried bioflocs biomass. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37(4) 335–341. <http://doi.org/10.4025/actascianimsci.v37i4.27043>
- Cedano-Castro M., Lujan-Bulnes, A., Hamilton, S. M. (2013). Crianza de *Oreochromis niloticus* Var chitralada en sistema. *Revista Científica de Estudiantes*, 1(2), 79–91.
- Chung, Y. C., Huang, C., Li, C. F. (2008). Removal Characteristics of H₂S by *Thiobacillus novellus* CH 3 Biofilter in Autotrophic and Mixotrophic Environments. *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*, A35(5), 1435-1450 <http://doi.org/10.1080/10934529709376619>
- Cohen, T., Gertler, A., Birk, Y. (1981). Pancreatic proteolytic enzymes and carboxypeptidase b. En *Comparative Biochemistry and Physiology* (Vol. 69B, pp. 639–646).
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W. (2010). The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*, 42, 559–567. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02353.x>

- Cuervo, J., Soler, J., Avilés, J., Pérez-Contreras, T., Navarro, C. (2010). Experimental feeding affects the relationship between hematocrit and body mass in Spotless Starling (*Sturnus unicolor*) nestlings. *Journal of Ornithology*, 152, 201–206. <http://doi.org/10.1007/s10336-010-0569-x>
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214–220. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- Daniel, N., Nageswari, P. (2017). Exogenous Probiotics on Biofloc Based Aquaculture : A Review. *Food Microbiology*, 5(1), 88–107.
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. (2008). The basics of bioflocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277, 125–137. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>
- Del’Duca, A., Evangelista, D., Galuppo, C., César, P. (2013). Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture*, 388-391, 115–121. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019>
- Dupuis, Y., Tardivel, S., Porembska, Z. (1991). Effect of some alkaline phosphatase inhibitors on intestinal calcium transfer. *International Journal of Biochemistry*, 23(2), 175–180.
- Ekasari, J., Crab, R., Verstraete, W. (2010). Primary Nutritional Content of Bio-Flocs Cultured with Different Organic Carbon Sources. *HAYATI Journal of Biosciences*, 17(3), 125–130. <http://doi.org/10.4308/hjb.17.3.125>
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G. (2013). Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry (pp. 301–328). <http://doi.org/DOI: 10.5772/53902>
- Epp, M. A., Ziemann, D. A., Schell, D. M. (2002). Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquaculture research*, 33, 839–846.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2), 271–278. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](http://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X)
- Essa, M. A., Serafy, S. S. E., El-ezabi, M. M., Daboor, M., Esmael, N. A., Lall, S. P. (2010). Effect of Different Dietary Probiotics on Growth , Feed Utilization and Digestive Enzymes Activities of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 5(2), 143–162.
- F. Jorand, F. Zartarian, F. Thomas, J. C. Block, J. Y. Bottero, G. Villemin, V. Urbain, J. M. (1995). Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Elsevier*, 29(7), 1639–1647.
- Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 48, 149-158. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x>

- Fernstrom, J. D. (2005). Branched-Chain Amino Acids and Brain Function. *The Journal of Nutrition*, 135(6), 1539–1546. <https://doi.org/10.1093/jn/135.6.1539S>
- Ferreira, J., Karollina, S., Siqueira, L., Rodrigo, C., Assis, D., Augusto, C., Souza, R. (2016). Digestive enzyme activity in the intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) under pond and cage farming systems. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(5). <http://doi.org/10.1007/s10695-016-0215-5>
- Fish, G. R. (1960). The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of Tilapia and Perch. *Hydrobiologia*, 15(1-2), 161–178.
- Fontenot, Q., Bonvillain, C., Kilgen, M., Boopathy, R. (2007). Effects of temperature, salinity, and carbon:nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology*, 98, 1700–1703.
- Gan, L., Zhou, L., Li, X., Yue, Y. (2016). Dietary leucine requirement of Juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. A 1040–1046. <http://doi.org/10.1111/anu.12353>
- Gatesoupe, F. J. (2000). Uso de Probióticos en Acuicultura, 463–472.
- Gominho-Rosa, C., Paula, A., Rodrigues, O., Mattioni, B., Francisco, A. De, Moraes, G., Machado, D. (2015). Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources : Digestibility , enzyme activity and starch microstructure. *Aquaculture*, 435, 92–99. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.035>
- González, P., Oyarzun, C. (2002). Variabilidad de índices biológicos en pingüipes *Chilensis valenciennes* 1833 (Perciformes, pingüipedidae): ¿están realmente correlacionados? *Gayana*, 66, 249–253. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382002000200023>
- Günther, J., Jiménez-montealegre, R. (2004). Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio. *Revista Biología Tropical*, 52, 937–943.
- Hamdan, A., Monroy, D. M. C. (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), 1-8. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.4406.2326>
- Hargreaves, J. A. (2013). Biofloc Production Systems for Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center, (4503), 1–12.
- Hassaan, M. S. (2014). Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(2), 199–208. <http://doi.org/10.1016/j.ejar.2014.04.001>
- Heidarieh, M., Mirvaghefi, A. R., Akbari, M., Sheikhzadeh, N., Kamyabi-Moghaddam, Z., Askari, H., Shahbazfar, A. A. (2013). Evaluations of Hilyses, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth performance, enzymatic activities and gastrointestinal structure. *Aquaculture Nutrition*, 19, 343–348. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00973.x>

- Hernández, J. (2014). Interacción mixotrófica de microalgas marinas y bacterias probióticas con enfoque a la formación de bioflocs para acuicultura. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 79 pp.
- Jauncey, K. (1982). The effects of varying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization and body composition of juvenile tilapias. *Aquaculture*, 27, 43–54. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90108-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90108-9)
- Jia, W., Huang, X., Li, C. (2014). A Preliminary Study of the Algicidal Mechanism of Bioactive Metabolites of *Brevibacillus laterosporus* on *Oscillatoria* in Prawn Ponds. *Scientific World Journal*, 2014(i). <http://dx.doi.org/10.1155/2014/869149>
- Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W. C., Horgen, F. D. (2008). Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture Research*, 39(2). 118–133. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01856.x>
- Kiron, V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 111–133. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015>
- Lara-flores, M., Olivera-Castillo, L., Olvera-Novoa, M. (2010). Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fish Aquaculture*, 2(4), 93–101.
- Lara-flores, M., Olvera-Novoa, M., E Guzmán-Méndez, B., López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216(1-4), 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00277-6)
- Lazado, C. C., Pedersen, P. B., Nguyen, H. Q., Lund, I. (2017). Rhythmicity and plasticity of digestive physiology in a euryhaline teleost fish, permit (*Trachinotus falcatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 212(2017), 107–116. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.07.016>
- Lehninger, A. L. (1984). *Bioquímica* (2a ed.). Barcelona, España: Omega, 1198 pp.
- Little, D. C., Francis, J., Azim, E., Boyd, K., Watterson, A., Young, A. (2008). Options for producing a warm-water fish in the UK: limits to “Green Growth”? *Trends in Food Science and Technology*, 19(2008), 255–264. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.12.003>
- Long, L., Yang, J., Li, Y., Guan, C., 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(2015), 135–141. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.017>

- Luo, G., Avnimelech, Y., Pan, Y., Tan, H. (2015). Effects of Temperature on Inorganic Nitrogen Dynamics in Sequencing Batch Reactors using Biofloc Technology to Treat Aquaculture Sludge. *Aquacultural Engineering*, 52(2013), 73–79. <http://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.09.003>
- Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L., Tan, H. (2014). Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture*, 423, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.023>
- Manoel, C., Vieira, N., Seiffert, W. Q. (2016). Soybean molasses as an organic carbon source in the farming of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a biofloc system, (Avnimelech 1999). *Aquaculture Research*, 48(4), 1–9. <http://doi.org/10.1111/are.13020>
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J. (1973). The aminopeptidase from Hog intestinal brush border. *Biochimica et Biophysica Acta*, 321(1), 282–295. [http://doi.org/10.1016/0005-2744\(73\)90083-1](http://doi.org/10.1016/0005-2744(73)90083-1)
- Mart, M., Becerra-d, M. J., Mart, L. R., Rivas-vega, M. E., Lopez-elias, A., Porchas-cornejo, M. A. (2012). Production Response and Digestive Enzymatic Activity of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Intensively Pregrown in Microbial Heterotrophic and Autotrophic-Based Systems. *The Scientific World JOURNAL*, 2012. <http://doi.org/10.1100/2012/723654>
- Martínez-Córdova, R. Porchas, M. Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? *Revista Internacional Contaminacion Ambiental*, 25(3), 181–196. <http://doi.org/181-196>
- Mesalhy, S., Ahmed, Y. A., Abdel-Aziz, A. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(1-2) 128–136. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013>
- Mohamed, A. H., Traifalgar, R. F., Serrano, A. E. (2013). Assessment of Probiotic Application on Natural Food, Water Quality and Growth Performance of Saline Tilapia *Oreochromis mossambicus* L. Cultured in Concrete Tanks. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2013: FAJ-, 8.
- Monroy Dosta, MC. Castro Barrera, T. Castro Mejía, J. Castro Mejía, G. De Lara Andrade, R. (2012). Beneficios del uso de probióticos en la flora bacteriana intestinal de los organismos acuáticos. *Contactos*, 85, 11–18.
- Montoya, A., López-Olmeda, J. F., Garayzar, A. B. S., Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light-dark cycle. *Physiology and Behavior*, 101(1), 101–107. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.019>

- Moreno, J. M., Muñoz, A. P., Wills, G. A. (2013). Efecto de la inclusión de diferentes fuentes de lípidos sobre parámetros productivos y composición proximal del filete de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) cultivada en jaulas flotantes. *Revista de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia* 60(45), 100–111.
- Moss, S. M., Divakaran, S., Kim, B. G. (2001). Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), *Aquaculture Research*, 49(3), 125–131.
- Moyano, F. J. (2006). Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas : Aplicaciones en Nutrición. En *Avances en Nutrición Acuícola VIII* (pp. 396–409).
- Nagase, G. (1964). Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters: digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Aquaculture Research*, 49(3), 270–284.
- Nootong, K., Pavasant, P. (2011). Effects of Organic Carbon Addition in Controlling Inorganic Nitrogen Concentrations in a Biofloc System. *World Aquaculture Society*, 42(3), 339–346. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2011.00472.x
- Norton, L. E., Layman, D. K. (2006). Branched-Chain Amino Acids in Exercise: Leucine Regulates Translation Initiation of Protein Synthesis in Skeletal Muscle after Exercise. *Journal of Nutrition*, 136(2), 533–537.
- Padmavathi, P., Sunitha, K., Veeraiah, K. (2012). Efficacy of probiotics in improving water quality and bacterial flora in fish ponds. *African Journal of Microbiology Research*, 6(49), 7471–7478. <http://doi.org/10.5897/AJMR12.496>
- Pérez, J. J., Wicki, G. A., Moyano, F. J., Alarcón, F. J. (2003). Evaluación del efecto de inhibidores de proteasa presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina ; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaerensis*). *CIVA*, 2003, 442–454.
- Pérez-Fuentes, J. A., Hernández-Vergara, M. P., Pérez-Rostro, C. I., Fogel, I. (2016). C: N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation. *Aquaculture*, 452, 247–251. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.010>
- Piedrahita, R. H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226, 35–44. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00465-4](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00465-4)
- Rajkumar, M., Pandey, P. K., Aravind, R. (2015). Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research*, 47(11), 1–13. <http://doi.org/10.1111/are.12792>
- Rakocy, J. E. (1989). Tank Culture of Tilapia. South Regional Aquaculture Center, (282) 4pp.
- Rakocy, J. E., Danaher, J. J., Bailey, D. S., Shultz, R. C. (2008). Development of a Biofloc system for the production of Tilapia. *Aquaculture*. 8 pp.

- Rivas-Vega, M. E., López-Pereira, J. L., Miranda-Baeza, A., Sandoval-Muy, M. I. (2012). Sustitución parcial de harina de sardina con moringa oleifera en alimentos balanceados para juveniles de tilapia (*Oreochromis mossambicus* X *Oreochromis niloticus*) cultivada en agua de mar. *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud*, 14, 3–10.
- Safari, R., Yosefian, M. (2006). Changes in TVN (Total Volatile Nitrogen) and psychrotrophic bacteria in Persian sturgeon Caviar (*Acipenser persicus*) during processing and cold storage. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(SUPPL. 1), 416–418. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.00997.x>
- Sanchez Ramirez, A. J. (2016). Crecimiento de la tilapia Spring (*Oreochromis niloticus*) alimentada con dos dietas, cultivada en un sistema biofloc inoculado con probióticos comerciales. Tesis de Maestria en Ciencias. Universidad Autonoma de Sinaloa. 88 pp.
- Sandoval-Muy, M. I., Guereña-Araiza, M. A., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, M. E. (2012). Metabolismo de rutina y actividad enzimática digestiva en juveniles de tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*) aclimatada a diferentes salinidades. *Biotecnia*, 14(2) <http://doi.org/10.18633/bt.v14i2.118>
- Sesay, M L. Özcengiz, G. Sanin, F. D. (2006). Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on bioflocculation. *Water Research*, 40(7), 1359–1366. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.045>
- Siddiqui, A. Q., Al-harbi, A. H. (1999). Nutrient budgets in tanks with different stocking densities of hybrid tilapia. *Aquaculture*, 170(3-4) 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00421-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00421-9)
- Soliman, A. K., Jauncey, K., Roberts, R. J. (1986). The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias. *Aquaculture*, 52(1). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90101-8)
- Soltan, M. A. (2009). Effect of Dietary Fish Meal Replacement by Poultry By-Product Meal with Different Grain Source and Enzyme Supplementation on Performance , Feces Recovery , Body Composition and Nutrient Balance of Nile Tilapia. *Journal of Nutrition*, 8(4), 395–407. DOI: 10.3923/pjn.2009.395.407
- Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H. O., Saka, Ş., Otgucuo, Ö., Küçüksari, H. (2008). *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280(1-4), 140–145. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.020>
- Tabor, C. W., Tabor, H. (1984). Polyamines. *Biochemistry*, 53, 749-90. DOI:10.1146/annurev.bi.53.070184.003533
- Tengjaroenkul, B., Smith, B. J., Caceci, T., Smith, S. A. (2000). Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia , *Oreochromis*. *Aquaculture*, 180(3-4) 317–327. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00270-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00270-7)

- Tovar-Ramirez, D., Reyes-Becerril, M., Guzman-Villanueva, L., Gleavez-Lopez, V., Civere-Cerecedo, R. (2008). Probióticos en acuicultura: Avances recientes del uso de las levaduras en peces marinos. *Recuperado de [Http://www. Uanl. mx/utilerias/nutricion_ acuicola/IX/archivos/12-Tovar. Pdf](http://www.Uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IX/archivos/12-Tovar.Pdf).*
- Wang, C., Pan, L., Zhang, K., Xu, W., Zhao, D., Mei, L. (2015). Effects of different carbon sources addition on nutrition composition and extracellular enzymes activity of bioflocs , and digestive enzymes activity and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-exchange culture tanks, (Tranvik 1988). *The Scientific World Journal*, 2012, 1–12. <http://doi.org/10.1111/are.12784>
- Wang, Y., Li, J., Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1-4). <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.002>
- Welker, T. L., Lim, C. (2011). Use of probiotics in diets of tilapia. *Journal of Aquaculture Research & Development*, S1(14), 1–8. <http://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-014>
- Xu, W., Pan, L. (2012). Effects of bioflocs on growth performance , digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C / N ratio in feed. *Aquaculture*, 356-357, 147–152. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.022>
- Yanbo, W., Zirong, X. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127(3-4), 283–292. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003>
- Yerushalmi, S., Green, R. M. (2009). Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecology Letters*, 12(9), 970–981. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01343.x>
- Yuan, D., Yi, Y., Yakupitiyage, A., Fitzsimmons, K., S. Diana, J. (2010). Effects of addition of red tilapia (*Oreochromis* spp.) at different densities and sizes on production, water quality and nutrient recovery of intensive culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in cement tanks. *Aquaculture*, 298, 226–238.
- Yuangsoi, B., Klahan, R., Charoenwattanasak, S. (2014). Partial replacement of protein in soybean meal by moringa seed cake (*Moringa oleifera*) in bocourti ' s catfish (*Pangasius bocourti*). *Journal of Science and Technology*, 36(2), 125–135.
- Zhang, N., Luo, G., Tan, H., Liu, W., Hou, Z. (2016). Growth , digestive enzyme activity and welfare of tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in a bio fl oc-based system with poly- β -hydroxybutyric as a carbon source. *Aquaculture*, 464, 710–717. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.013>
- Ziaei-nejad, S., Habibi, M., Azari, G. (2006). The effect of *Bacillus* spp . bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity , survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252(2-4), 516–524. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>

Referencia electrónica

(<http://ecotechnology.com.mx/eco-aquablend/eco-aquaprotect>)

ANEXOS

Anexo 1: Reactivo 1 Somogy-Nelson

Todos los ingredientes para la preparación de este reactivo se añadieron en el orden que muestra la tabla 5. Una vez añadido el agua, se procedió a mezclar todo con un mosquetón magnético hasta que todos los ingredientes quedaron homogéneos y disueltos. Posteriormente se aforo a 100 ml con agua destilada. El reactivo se conservó en una incubadora a 37 °C constantes. Si llegase a precipitar el reactivo, este puede ser filtrado, en este caso no ocurrió ninguna precipitación.

Tabla 5. Ingredientes y cantidades para la preparación del reactivo 1.

ml totales	100
Carbonato de sodio anhidro (gr)	2.5
Tartrato sódico potásico (gr)	2.5
Bicarbonato sódico (gr)	2
Sulfato sódico anhidro (gr)	20
Agua destilada (ml)	8

Anexo 2: Reactivo 2 Somogy-Nelson

Se prepararon 10 ml de este reactivo. Todos los ingredientes fueron agregados en el orden que se muestra en la tabla 6. Una vez añadidos todos los ingredientes, se agitaron y mezclaron con un mosquetón magnético y posteriormente el reactivo se conservó a temperatura ambiente.

Tabla 6. Ingredientes y cantidades para la preparación del reactivo 2.

ml totales	10
Sulfato cúprico pentahidratado (gr)	1.5
H ₂ O destilada (ml)	10
Ácido sulfúrico concentrado (gotas)	0.2

Anexo 3: Reactivo 3 Somogy-Nelson

Este reactivo se preparó en dos etapas. En la primera se toma un vaso de precipitado, se agregaron 5 gr de molibdato amónico, 60 ml de agua destilada, 4.2 ml de ácido sulfúrico (tabla 7) y se agitaron y mezclaron. En otro vaso de precipitado se agregó 0.6 gr de arseniato sódico, 5 ml de agua destilada y se mezclaron. Posteriormente se agrega lentamente el segundo vaso de precipitado en el primero, se aforo a 100 ml y se calentó en un baño de agua a 37 °C. Posteriormente este reactivo se conservó a 37 °C en una incubadora.

Tabla 7. Ingredientes y cantidades para la preparación del reactivo 3.

MI totales	100
Molibdato amónico (gr)	5
H ₂ O destilada (ml)	90
Ácido sulfúrico concentrado (ml)	4.2
Arseniató sódico heptahidratado (gr)	0.6
H ₂ O destilada (ml)	5

Anexo 4: Reactivo 4 Somogy-Nelson

Este reactivo se preparó justo antes de usarse. Consistió en añadir 1 ml del reactivo 2 por cada 25 ml del reactivo 1. Se prepararon 78 ml para todas las muestras (tabla 8).

Tabla 8. Ingredientes y cantidades para la preparación del reactivo 4.

ml totales	78
Reactivo 1	75
Reactivo 2	3

Tampón fosfato de sodio dibásico y citrato de sodio monohidratado

Para 50 ml de buffer se pesaron 1.34 gr de fosfato de sodio dibásico al 0.1 M y 1.07 gr de citrato de sodio monohidratado al 0.1 M. Se mezclaron los dos reactivos con un agitador magnético en 35 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH al 0.05 M y se aforo a 50 ml con agua destilada.

Anexo 5: Solución de almidón soluble al 2% (sigma, S 2630)

Se hirvieron 100 ml de agua destilada y se suspendieron 2 gr de almidón en 2-4 ml de metanol. Se retiró del calor el agua y se le agrego el almidón lentamente. Posteriormente se dejó hervir por 20 minutos cuidando que no se secase y al final se aforo a 100 ml con agua destilada. El reactivo se conservó a 4 °C en un refrigerador convencional.