DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Efecto de *Rhodotorula glutinis* (Harrison, 1928) en la expresión de genes de la respuesta inmune innata, estrés oxidativo, índices biológicos y parámetros de calidad del agua en *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) cultivada en sistema biofloc”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M en C.A Daniel Becerril Cortés

COMITÉ TUTORAL

Dra. María del Carmen Monroy (Codirector)

Dra. Aida Hamdan Partida (Codirector)

Dr. José Antonio Mata Sotres (Asesor)

Ciudad de México, a 21 de febrero de 2025

Resumen

En esta investigación se evaluó el efecto de la adición en la dieta y el agua de la levadura *Rhodotorula glutinis* en la expresión de genes de la respuesta inmune innata y de estrés oxidativo en *Oreochromis niloticus* cultivada en sistema biofloc. Tras un ensayo de alimentación de 12 semanas, se valoraron tres grupos experimentales, un cultivo convencional con recambio de agua (control), un cultivo de biofloc (BFT) y biofloc con la adición de la levadura viva *R. glutinis* $1x10^6$ UFC ml^{-1} (BFT+Rg), con cuatro réplicas por tratamiento. En todos los casos, se les suministró a los organismos alimento comercial (Pedregal®, 32 % de proteínas y 5 % de de lípidos totales). Se distribuyeron 180 juveniles de *O. niloticus* (7.02 ± 0.04 g y 6.99 ± 1.01 cm) aleatoriamente en 12 tanques con 75 L, 0.2 peces/L: 15 peces/tanque, se registró la ganancia de peso (GP), ganancia de longitud (GL), la tasa de supervivencia (SR %), el factor de condición de Fulton (FC), factor de conversión alimenticia (FCA) y el índice hepatosomático (IHS). Se monitoreó el pH, la temperatura, y oxígeno disuelto diariamente a las 09:00h. El nitrógeno total amoniacal (TAN), nitrito y nitrato se midieron cada 10 días. Los sólidos sedimentables se midieron una vez por semana mediante un cono Imhoff. Al final del experimento para evaluar la expresión de genes relacionados con la inmunidad innata (*trf, il1b, tgfb, fntα, hsp70*) y con el estrés oxidativo (*sod, cat, gpx*), se sacrificaron ocho peces al azar por tratamiento y se extrajeron en frío bajo condiciones asépticas 50mg de hígado e intestino distal, que fueron almacenados en RNAlater a -80 °C hasta su posterior procesamiento. El tratamiento BFT+Rg mostró un incremento significativo ($p<0.05$) en ganancia de peso (39.37 ± 1.7 g), en peso final (46.30 ± 1.75 g) y talla final (14.14 ± 088 cm) respecto a los otros tratamientos. La supervivencia general fue de 89.33% ± 4.91 sin diferencias significativas entre grupos experimentales ($p>0.05$). La presencia de *R. glutinis* influyó directamente en la expresión de genes de ambos tejidos analizados. Los niveles de expresión de los genes *tnfa* (2.67), *tgfb* (3.15) y *hsp70* (0.512) en el hígado aumentaron significativamente ($p<0.05$) en el tratamiento BFT+Rg. En el intestino se observó un aumento significativo ($p<0.05$) en los patrones de expresión de *il1b* (11.99), *tnfa* (2.67), *tgfb* (5.90), *trf* (4.44), *hsp70* (255.73), *gpx* (3.11) y *cat* (3.78) en el tratamiento BFT+Rg. Con base en los resultados, se sugiere el uso de *R. glutinis* como estrategia factible para mejorar el crecimiento, la inmunidad innata y la actividad antioxidante de la tilapia en su cultivo en sistemas biofloc.

Palabras clave: BFT, expresión génica, estrés oxidativo, inmunidad innata, levadura *Oreochromis niloticus*, probióticos.

Dra. Maria del Carmen Monroy Dosta

Dr. Jose Antonio Mata Sotres

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo, del Departamento El Hombre y su Ambiente y en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, del Departamento de Atención a la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Monroy Dosta del Departamento El Hombre y su Ambiente y de la Dra. Aida Hamdan Partida, del Departamento de Atención a la Salud. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. José Antonio Mata Sotres.

El autor agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) (antes CONAHCyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 763361, que comprendió del periodo del 18 septiembre de 2018 al 31 de agosto de 2022. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de la Secihti (antes Padrón Nacional de Posgrados de Calidad), además cuenta con apoyo de la misma Secretaría con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Daniel Becerril Cortés

Nombre del alumno

Fecha de aprobación de la tesis

21 de febrero de 2025

JURADO:

Presidente

Dr. Luis Daniel Espinosa Chaurand

Secretario

Dr. José Antonio Mata Sotres

Vocal 1

Dr. André Luiz Braga Souza

Vocal 2

Dra. María del Carmen Monroy Dosta

Vocal 3

Dra. Aida Hamdan Partida

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00157
Matrícula: 2183804848

"El efecto de Rhodotorula glutinis (Harrison, 1928) en la expresión de genes de la respuesta inmune innata, estrés oxidativo, índices biológicos y parámetros de calidad del agua en Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) cultivada en sistema biofloc"

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 21 del mes de febrero del año 2025 en la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DEL CARMEN MONROY DOSTA
DR. JOSE ANTONIO MATA SOTRES
DR. LUIS DANIEL ESPINOSA CHAURAND
DR. ANDRE LUIZ BRAGA DE SOUZA
DRA. AIDA HAMDAN PARTIDA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: DANIEL BECERRIL CORTES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DANIEL BECERRIL CORTES
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. LUIS AMADO AYALA PEREZ

PRESIDENTA

DRA. MARIA DEL CARMEN MONROY DOSTA

VOCAL

DR. JOSE ANTONIO MATA SOTRES

VOCAL

DR. LUIS DANIEL ESPINOSA CHAURAND

VOCAL

DR. ANDRE LUIZ BRAGA DE SOUZA

SECRETARIA

DRA. AIDA HAMDAN PARTIDA

Contenido

Resumen 12

Índice de figuras 18

Índice de tablas 19

Abreviaturas 19

Resumen 21

Abstract 22

1. Introducción 23

2. Marco teórico 26

2.1 Generalidades de la acuicultura 26

2.2 Generalidades de la Tecnología biofloc 26

2.2.1. Bioflóculos (definición y caracterización) 28

2.2.2. Requerimientos ambientales de *Oreochromis niloticus* y del sistema BFT 29

2.2.3. Fuente orgánica de carbono 32

2.3 Tilapia del Nilo (Generalidades de la especie) 32

2.3.1 Clasificación taxonómica 33

2.3.2 Características morfológicas 33

2.3.3 Morfología externa 33

2.3.4 Morfología interna 34

2.4. Enfermedades comunes en tilapia 35

2.5 Sistema inmune de peces óseos 38

2.5.1 Respuesta inmune innata 39

2.5.2 Barreras físicas 40

2.5.3 Componentes humorales 41

2.5.4. Componentes celulares 43

2.5.5. Inflamación 43

2.5.6. Fagocitosis y citotoxicidad no especifica 44

2.6. Inmunidad adquirida 45

2.7. Estrés oxidativo 46

2.8. Probióticos en acuicultura 48

2.8.1. *Rhodotorula* 51

2.8.2. *Rhodotorula glutinis* 51

3. Antecedentes 53

3.1 Probióticos en acuicultura 53

3.2. Implementación de BFT y su efecto en la respuesta inmune y defensa antioxidante con y sin probióticos 54

3.3. Análisis de expresión genética en acuicultura 55

4. Pregunta de investigación 58

¿Cómo modifica la adición de *R. glutinis* la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata (*trf, il1b, fntα, tgfb, hsp70*) y el estrés oxidativo (*sod, cat, gpx*), así como en los índices biológicos y parámetros de calidad del agua de *O. niloticus* cultivados en un sistema biofloc, y cuál es su impacto en la salud y el crecimiento de los peces? 58

5. Hipótesis 58

La incorporación de *R. glutinis* en el agua y dieta de *O. niloticus* cultivada en un sistema biofloc estimulará la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata *(trf, il1b, fntα, tgfb, hsp70*), induciendo al mismo mejor respuesta de los genes de estrés oxidativo(*sod, cat, gpx*). Además, se espera que esta levadura mejore los índices biológicos de los peces, como el crecimiento y la supervivencia, y optimice los parámetros de calidad del agua del sistema de cultivo 58

6. Objetivo general 58

Evaluar el impacto de la suplementación con *R. glutinis* en la modulación de genes de respuesta inmune innata (*trf, il1b, fntα, tgfb, hsp70*), estrés oxidativo (*sod, cat, gpx*) y el crecimiento de *O. niloticus* cultivados en sistemas biofloc, así como su efecto en la calidad del agua. 58

6. 1. Objetivos específicos 58

7. Materiales y métodos 59

7.1. Material biológico 59

7.2. Diseño experimental 59

7.3. Condiciones de cultivo 59

7.4. Control de la calidad del agua 60

7.5. Biometrías 61

7.6. Extracción de ARN y PCR cuantitativa 62

7.7. Análisis de datos 64

8. Resultados 65

8.1 Parámetros de la calidad del agua 65

8.2 Índices biológicos de *Oreochromis niloticus* 66

8.3 Expresión génica 68

8.4 Análisis de correlación de variables 73

8.5 Efecto combinado de los parámetros de calidad del agua, índices biológicos y expresión de genes 74
9. Discusión 78
10. Conclusiones 89
11. Recomendaciones generales 89
12. Referencias bibliográficas 90
13. Anexos 111
13.1 Artículos derivados de la presente tesis 111
13.2 Presentación en congreso internacional 113
13.3 Tabla de calidad del agua con valores máximos, mínimos y promedio general. .. 114

Índice de figuras

Figura Nº		**Página**
1.	Morfología externa de *Oreochromis niloticus*	22
2.	Morfología interna de *Oreochromis niloticus*	23
3.	Expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta inmune innata en hígado de *Oreochromis niloticus*	54
4.	Expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo en hígado de *Oreochromis niloticus*	55
5.	Expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta inmune innata en intestino de *Oreochromis niloticus*	56
6.	Expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo en intestino de *Oreochromis niloticus*	57
7.	Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune en hígado en función del peso y la talla	63
8.	Expresión relativa de genes relacionados con estrés oxidativo en función de compuestos nitrogenados	64
9.	Expresión relativa de genes de respuesta inmune innata en intestino en función de la talla y peso	65
10.	Expresión relativa de genes relacionados con parámetros ambientales en intestino	66

Índice de tablas

Tabla		Página
1.	Parámetros de calidad del agua para cultivo de tilapia en BFT y sus intervalos óptimos	17
2.	Principales órganos del sistema inmune de peces óseos y sus funciones	26
3.	Cepas probióticas y su efecto sobre la inmunidad de *Oreochromis niloticus*	37
4.	Especies acuícolas y genes explorados en estudios de expresión génica	42
5.	Pares de cebadores utilizados para q-PCR	49
6.	Parámetros de calidad del agua de los grupos experimentales	51
7.	Rendimiento de crecimiento e índices biológicos de Tilapia	52

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
BFT	Tecnología biofloc
BFT+Rg	Tecnología biofloc más la adición de *R.glutinis*
cat	Gen catalasa
CAT	Catalasa
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
OD	Oxígeno disuelto
EGC	Células eosinofílicas granulares
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FC	Factor de condición
FR	Radicales libres
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
GI	Tracto gastrointestinal
GP	Ganancia de peso
gpx	Gen glutatión peroxidasa
GSH-Px	Glutatión peroxidasa
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
hsp70	Gen proteína de shock térmico 70
FCA	Factor de conversión alimenticia

Ig	Inmunoglobulina
IHS	Índice hepatosomático
IL-1	Interleucina 1
il1b	Gen interleucina-1β
LPS	Lipopolisacáridos
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
Min	Minutos
Mm	Milímetros
MOS	Manano-oligosacáridos
NCC	Células citotóxicas no especificas
NO	Óxido nítrico
O_3	Ozono
OH	Radical hidroxilo
ES	Estrés oxidativo
PAMPs	Patrones moleculares: los asociados a patógenos
pH	Potencial hidrogeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
sod	Gen superóxido dismutasa
SOD	Superóxido dismutasa
TAN	Nitrógeno total amoniacal
tgfb	Gen factor de crecimiento transformante
TiLV	Virus de la tilapia del lago
tnfa	Gen factor de necrosis tumoral alfa
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
trf	Gen transferrina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Resumen

En esta investigación se evaluó el efecto de la adición en la dieta y el agua de la levadura *Rhodotorula glutinis* en la expresión de genes de la respuesta inmune innata y de estrés oxidativo en *Oreochromis niloticus* cultivada en sistema biofloc. Tras un ensayo de alimentación de 12 semanas, se valoraron tres grupos experimentales, un cultivo convencional con recambio de agua (control), un cultivo de biofloc (BFT) y biofloc con la adición de la levadura viva *R. glutinis* $1x10^6$ UFC ml^{-1} (BFT+Rg), con cuatro réplicas por tratamiento. En todos los casos, se les suministró a los organismos alimento comercial (Pedregal®, 32 % de proteínas y 5 % de de lípidos totales). Se distribuyeron 180 juveniles de *O. niloticus* (7.02 ± 0.04 g y 6.99 ± 1.01 cm) aleatoriamente en 12 tanques con 75 L, 0.2 peces/L: 15 peces/tanque, se registró la ganancia de peso (GP), ganancia de longitud (GL), la tasa de supervivencia (SR %), el factor de condición de Fulton (FC), factor de conversión alimenticia (FCA) y el índice hepatosomático (IHS). Se monitoreó el pH, la temperatura, y oxígeno disuelto diariamente a las 09:00h. El nitrógeno total amoniacal (TAN), nitrito y nitrato se midieron cada 10 días. Los sólidos sedimentables se midieron una vez por semana mediante un cono Imhoff. Al final del experimento para evaluar la expresión de genes relacionados con la inmunidad innata (*trf, il1b, tgfb, fntα, hsp70*) y con el estrés oxidativo (*sod, cat, gpx*), se sacrificaron ocho peces al azar por tratamiento y se extrajeron en frío bajo condiciones asépticas 50mg de hígado e intestino distal, que fueron almacenados en RNAlater a -80 °C hasta su posterior procesamiento. El tratamiento BFT+Rg mostró un incremento significativo ($p<0.05$) en ganancia de peso (39.37 ± 1.7 g), en peso final (46.30 ± 1.75 g) y talla final (14.14 ± 088 cm) respecto a los otros tratamientos. La supervivencia general fue de 89.33% ± 4.91 sin diferencias significativas entre grupos experimentales ($p>0.05$). La presencia de *R. glutinis* influyó directamente en la expresión de genes de ambos tejidos analizados. Los niveles de expresión de los genes *tnfa* (2.67)*, tgfb* (3.15) y *hsp70* (0.512) en el hígado aumentaron significativamente ($p<0.05$) en el tratamiento BFT+Rg. En el intestino se observó un aumento significativo ($p<0.05$) en los patrones de expresión de *il1b* (11.99*), tnfa* (2.67), *tgfb* (5.90)*, trf* (4.44)*, hsp70* (255.73)*, gpx* (3.11) y *cat* (3.78) en el tratamiento BFT+Rg. Con base en los resultados, se sugiere el uso de *R. glutinis* como estrategia factible para mejorar el crecimiento, la inmunidad innata y la actividad antioxidante de la tilapia en su cultivo en sistemas biofloc.

Palabras clave: BFT, expresión génica, estrés oxidativo, inmunidad innata, levadura *Oreochromis niloticus*, probióticos.

Abstract

This research evaluated the effect of the addition of *Rhodotorula glutinis* yeast in the diet and water on the expression of innate immune response and oxidative stress genes in Oreochromis niloticus cultured in a biofloc system. After a 12-week feeding trial, three experimental groups were assessed, a conventional culture with water replacement (control), a biofloc culture (BFT) and biofloc with the addition of the live yeast *R. glutinis* 1x106 CFU ml-1 (BFT+Rg), with four replicates per treatment. In all cases, commercial feed (Pedregal®, 32 % protein and 5 % lipids of total lipids) was fed to the organisms. A total of 180 O. niloticus juveniles (7.02 ± 0.04 g and 6.99 ± 1.01 cm) were randomly distributed in 12 tanks with 75 L, 0.2 fish/L: 15 fish/tank, weight gain (WG), survival rate (SR %), Fulton's condition factor (FC), feed conversion factor (FCA) and hepatosomatic index (IHS) were recorded. pH, temperature, and dissolved oxygen were monitored daily at 09:00h. Total ammonia nitrogen (TAN), nitrite and nitrate were measured every 10 days. Sedimentable solids were measured once a week using an Imhoff cone. At the end of the experiment to evaluate the expression of genes related to innate immunity (*trf, il1b, tgfb, fntα, hsp70*) and oxidative stress (*sod, cat, gpx*), eight fish were randomly sacrificed per treatment and 50 mg of liver and distal intestine were cold extracted under aseptic conditions and stored in RNAlater at -80 °C until further processing. The BFT+Rg treatment showed significant differences in favor ($p<0.05$) in weight gain (39.37 ± 1.7 g), final weight (46.30 ± 1.75 g) and final length (14.14 ± 088 cm) with respect to the other treatments. Overall survival was 89.33% ± 4.9 1 with no significant differences between experimental groups ($p<0.05$). The presence of *R. glutinis* directly influenced gene expression in both tissues analyzed. The expression levels of *tnfa* (2.67), *tgfb* (3.15) and *hsp70* (0.512) genes in the liver were significantly increased ($p<0.05$) in the BFT+Rg treatment. In the intestine, a significant increase ($p<0.05$) in the expression patterns of *il1b* (11.99), *tnfa* (2.67), *tgfb* (5.90), *trf* (4.44), *hsp70* (255.73), *gpx* (3.11) and *cat* (3.78) was observed in the intestine in the BFT+Rg treatment. Based on the results, the use of *R. glutinis* is suggested as a feasible strategy to improve growth, innate immunity and antioxidant activity of tilapia cultured in biofloc systems.

Key words: BFT, gene expression, oxidative stress, innate immunity, yeast, *Oreochromis niloticus,* probiotics.

1. Introducción

En las últimas décadas la tecnología o sistema biofloc (BFT) ha sido muy atractiva debido a sus beneficios en comparación con las técnicas tradicionales de acuicultura, proporcionando un enfoque más sostenible con un mínimo intercambio de agua y con una reducción en el suministro de alimento balanceado, lo que la convierte en una tecnología de bajo costo (tras la inversión inicial) para el desarrollo de la acuicultura (Khanjani y Sharifinia, 2020; Kumar et al., 2021; Ogello et al., 2021). Además, permite reducir la fuerte dependencia de la harina de pescado en las dietas formuladas (Bossier y Ekasari 2017; Kumar et al., 2021).

El sistema biofloc tiene como principio aprovechar los residuos de alimento no consumido, materia orgánica y compuestos inorgánicos tóxicos, a través de los microrganismos presentes en el propio estanque, la adición de una fuente de carbono externa y un alto nivel de aireación (Khanjani y Sharifinia, 2020). Esto propicia condiciones favorables para la de producción de flóculos microbianos; lo que genera condiciones de dominancia a comunidades bacterianas quimio / foto autótrofas y heterótrofas, las cuales utilizan nutrientes inorgánicos en la columna de agua (Avnimelech, 2009), en donde las bacterias heterótrofas son el grupo predominante de la comunidad BFT (Ahmad et al., 2017; Kumar et al., 2021). Así mismo, los flóculos están conformados por levaduras, algas (dinoflagelados y diatomeas), flagelados, rotíferos, ciliados, copépodos, nematodos y detritus (Khanjani y Sharifinia, 2020). Estos microorganismos pueden asimilar los contaminantes inorgánicos de la columna de agua y proporcionar a los peces proteína microbiana durante el periodo de cultivo (Emerenciano et al., 2017).

Por otra parte, los microorganismos que se desarrollan en los flóculos podrían participar en la estimulación del sistema inmunitario de las especies en cultivo (Menaga et al., 2019; Tepaamorndech et al., 2020). En este sentido, algunos investigadores mencionan que los componentes celulares o productos metabólicos de la microbiota presente en el biofloc tienen potencial probiótico, inmunoestimulante y antioxidante (Tepaamorndech et al., 2020; Van Doan et al., 2020), por la presencia de compuestos bioactivos como carotenoides, clorofilas, aminoácidos libres, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales traza (Ahmad et al., 2017; Bossier y Ekasari, 2017).

La suplementación con probióticos al BFT es una técnica relativamente reciente, y la información generada sobre los beneficios de este procedimiento es aún escasa (Daniel y

Nageswari, 2017; Bañuelos-Vargas et al., 2021). Tradicionalmente, las bacterias lácticas han sido ampliamente utilizadas en organismos acuáticos (Pandiyan et al., 2013). Sin embargo, en la acuicultura se han considerado como probióticos potenciales diversos géneros de microorganismos, tanto bacterias como levaduras (Rima et al., 2012; Navarrete y Tovar 2014; Newaj et al., 2014). Entre estos géneros se encuentran *Bacillus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Debaryomyces, Saccharomyces, Weisella, Vagococcus, Rhodotorula, Rhodococcus, Micrococcus*, etc. (Jahangiri y Esteban, 2018; El-Saadony et al., 2021).

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la columna de agua, sedimentos, plantas y animales acuáticos (Ferreira et al., 2022), y desempeñan diversos roles en el medio acuático, como en la descomposición de sustratos, reciclaje de nutrientes, biodegradación de aceites y compuestos recalcitrantes (Ferreira et al., 2022; Navarrete y Tovar, 2014).

Las propiedades probióticas de las levaduras en acuicultura han sido escasamente estudiadas, pero se les atribuyen propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes, además de aportar nutrientes como vitaminas E y B, aminoácidos, proteínas, manano-oligosacáridos (MOS) y lípidos (Navarrete y Tovar, 2014; Schafberg et al., 2020; Ge et al., 2021). Además, algunas especies aportan un alto contenido en carotenoides (Schafberg et al., 2020; Ge et al., 2021).

Otra ventaja del uso de las levaduras es que no se ven afectadas por los compuestos antibacterianos, y algunas cepas tienen actividades antagónicas contra las bacterias patógenas (Rima et al. 2012; Navarrete y Tovar 2014; Caruffo et al., 2015).

Particularmente el género *Rhodotorula* es común en varios ambientes y se ha aislado del suelo, vegetación, agua dulce y salada, alimentos (leche, jugos de frutas), piel humana y heces, además se ha reportado como parte de la microbiota normal de peces en vida silvestre y de piscicultura (Gatesoupe, 2007; Kot et al., 2016; Gerelmaa et al., 2018; Chen et al., 2019). Las cepas pertenecientes a este género se han utilizado en la acuicultura para promover la respuesta inmune, la capacidad antioxidante, la resistencia a las enfermedades y aumentar la pigmentación en especies como el salmón, el pepino de mar y la tilapia (Ueno et al., 2011; Wang et al., 2015; Wang et al., 2019). De igual manera se ha incorporado en la dieta con el fin de aumentar el valor nutricional del alimento vivo en la acuicultura como, por ejemplo, los cladóceros (Khudyi et al., 2018).

Esta levadura es una buena fuente de lípidos, enzimas, vitaminas, MOS y carotenoides (β-caroteno, toruleno y torularhodina) (Bhosale, 2004; Kot et al., 2016; Gerelmaa et al., 2018). Es muy valorada en la industria farmacéutica (Bhosale et al., 2002), cosmética (Anunnciato y Rocha, 2012), alimentaria, así como en medicina (Saenge et al., 2011; Hernández et al., 2014), no sólo como precursores de la vitamina A, sino también por su pigmentación, antioxidantes, posible actividad inhibidora de tumores y potenciación de la respuesta inmune que conduce a la protección contra las infecciones por bacterias y hongos (Bhosale, 2004; Hernández et al., 2014; Kushniryk et al., 2015). Dicho género es capaz de utilizar muchas fuentes de carbono como nutriente para su metabolismo como; glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, etanol, glicerol y hexadecano (Navarrete y Tovar 2014; Kot et al., 2016; Gerelmaa et al., 2018

Por su parte, la tilapia (*Oreochromis niloticus*) es reconocida como una especie se suma importancia para la acuicultura, debido a su rápido crecimiento, su fácil adaptación al cultivo intensivo y su tolerancia a niveles moderados de oxígeno (Bosisio et al., 2017; Yilmaz, 2019; El-Sayed, 2020). Además de poseer características ideales para su producción en biofloc, y una gran capacidad para alimentarse de diversos sustratos, así como partículas suspendidas en la columna de agua, masas microbianas, y microorganismos presentes en el biofloc (Lumsangkul et al., 2021; Ogello et al., 2021). No obstante, la intensificación de su producción ha incidido en la manifestación de enfermedades infecciosas, dando lugar a considerables tasas de mortalidad e importantes pérdidas económicas (Lumsangkul et al., 2021).

La adición de probióticos y el cultivo de tilapia en biofloc son prácticas independientes que se utilizan comúnmente en la acuicultura. Sin embargo, existe muy poca información sobre el uso de estas tecnologías utilizadas conjuntamente en el cultivo de tilapia. Debido a lo anterior, este estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de la levadura *Rhodotorula. glutinis* en el crecimiento, la expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune y la actividad antioxidante de la tilapia del Nilo criada en condiciones de BFT.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades de la acuicultura

La acuicultura se define como la cría de organismos acuáticos, comprendidos peces, moluscos, crustáceos y plantas (Metian et al., 2020). Esta actividad permite producir selectivamente las especies económicamente más atractivas. Además, ayuda a reducir la presión sobre las poblaciones de peces silvestres sobreexplotados por la pesca y también ayuda a cubrir la creciente demanda de proteína de alta calidad para el consumo humano. (El Sayed, 2006). Asimismo, es considerada como una de las actividades económicas de mayor crecimiento a nivel mundial, según cifras de la producción de peces de aleta alcanzó 54,3 millones de toneladas, $139 700 millones de USD, destacándose la tilapia por el aumento de su producción en distintos continentes (FAO, 2022).

La acuicultura se clasifica de manera diferente según el tipo de hábitat (agua dulce o salada), el tipo o densidad del cultivo o el grado de tecnología utilizada para producir los organismos acuáticos (moluscos, crustáceos y peces), estos últimos se pueden dividir en sistemas integrales, semi intensivos, intensivos o hiper intensivos (Campos et al., 2012). Los sistemas recién mencionados son considerados sistemas tradicionales o convencionales de cultivo, una de sus características es que, para garantizar las condiciones óptimas de cultivo, se efectúan constantes recambios de agua que pueden ir desde 10 a 50 % diario (Estrada et al., 2023). Las descargas provenientes de estos recambios se caracterizan por ser ricas en nutrientes, provenientes del alimento no consumido y las excretas de los peces, de igual manera van cargadas de potenciales patógenos, así como residuos de antibióticos y medicamentos, lo que conlleva a la contaminación de los cuerpos de agua receptores (Salas et al., 2016).

2.2 Generalidades de la Tecnología biofloc

Un sistema de producción que ha llamado la atención en los últimos años es la tecnología biofloc (BFT por sus siglas en inglés) (Ogello et al., 2021). Es una forma de producción acuícola intensiva, este sistema de cultivo permite enfrentar desafíos específicos de la actividad, como el aumento de la biomasa por volumen de agua utilizado, lo que conlleva

a la menor utilización del recurso hídrico (Avnimelech, 2015). El término "floc o biofloc" puede definirse como floculación de materia orgánica presente en el medio, dando como resultado la producción de altas concentraciones de biomasa en forma de partículas (Cuzon et al., 2004). Otra característica de este tipo de sistema de cultivo es el mínimo o ningún recambio en el agua y alta aireación y oxigenación de la columna de agua (Piñeros et al., 2020).

Dicho sistema de cultivo fue desarrollado en la década de los 70's con diferentes especies de importancia económica (Emerenciano et al., 2013). En los sistemas BFT al aire libre, las microalgas preceden el proceso de floculación, normalmente conforman el sustrato al que se adhieren los flóculos o biofloc y, cuando estas son las condiciones predominantes en el sistema, se le denomina sistema fotoautótrofo o "biofloc verde" (Avnimelech, 2015; Ogello et al., 2021). En estos sistemas, una compleja mezcla de procesos algales y bacterianos controla la calidad del agua (Wasave et al., 2020).

En condiciones sin exposición a luz natural (cultivos en interiores), principalmente las bacterias preceden la formación de flóculos y se denomina sistema "heterótrofo o biofloc marrón/café", en estas circunstancias al añadir una fuente de carbono adecuada, las células bacterianas estimulan una red trófica, que implica la descomposición de los residuos orgánicos por parte de las bacterias y, además, en condiciones óptimas de aireación, produce miles de millones de células bacterianas (autótrofas y heterótrofas) que a su vez atraen miles de millones de otros microorganismos fitopanctónicos, zooplanctónicos y hongos (Ogello et al., 2021).

El principio básico es reciclar los nutrientes manteniendo un alto contenido de carbono/nitrógeno (C/N) en el agua para promover el crecimiento de bacterias heterótrofas. que junto con otros grupos microbianos fotoautótrofos y bacterias quimio autótrofas, logran un correcto aprovechamiento del nitrógeno del estanque, el cual es de suma importancia en los ambientes acuícolas (Collazos y Arias, 2015; Araiza y Rodríguez, 2019).

El N puede estar presente en diversas formas dentro de los estanques, siendo los nitratos (NO_3-) y el amonio (NH_4) los más importantes para la generación de redes tróficas, ya que constituyen la fuente principal de N biodisponible para microorganismos fotoautótrofos. El amonio y el nitrito (NO_2) son tóxicos para los peces y pueden convertirse en un factor limitante en su crecimiento y supervivencia, por lo que removerlo o transformarlo en

nitrógeno menos tóxico es de suma importancia (Collazos y Arias, 2015; Robles et al., 2020).

En los sistemas BFT se tienen tres vías de conversión de nitrógeno: 1) Absorción de nitrógeno por organismos fotoautótrofos 2) Descomposición del amonio en nitrito y después en nitrato por parte de bacterias quimio autotróficas y 3) Asimilación de amonio por bacterias heterótrofas directamente a biomasa bacteriana (Jiménez et al., 2018; Araiza y Rodríguez, 2019). Estas últimas se distinguen por tener un rápido crecimiento, pudiendo establecer poblaciones viables en apenas horas, en comparación las bacterias quimio autotróficas, las cuales necesitan alrededor de 30 días para su establecimiento en el tanque de cultivo (Collazos y Arias, 2015; Emerenciano et al., 2017). Sin embargo, para lograr el establecimiento de las bacterias heterótrofas en los bioflóculos es necesario ajustar la relación C/N en el cuerpo de agua, ya que se requiere cerca de 20 unidades de carbono por una unidad de nitrógeno, esto se logra adicionando alimento de baja proteína y un carbohidrato en cantidad suficiente (Avnimelech, 2015).

2.2.1. Bioflóculos (definición y caracterización)

La biomasa microbiana con la adición de otros microorganismos y partículas suspendidas en el agua forma “bioflocs” (Ekasari y Maryam, 2012). Los flóculos o bioflocs son compuestos formados por entre un 60% y un 70% de materia orgánica, incluyendo una mezcla heterogénea de microorganismos (hongos, algas, bacterias, protozoos y rotíferos) y entre un 30% y un 40% de materia orgánica y células muertas. (Chu y Lee, 2004).

Los bioflocs son muy pequeños, de unos 50 a 200 micrómetros de tamaño, de forma irregular y más densos que el agua, por lo que tienden a precipitarse lentamente, se mantienen adheridos en una matriz a través de diferentes mecanismos: a) atracción electrostática b) mediante el moco secretado por bacterias o c) por microorganismos filamentosos (Azim y Little, 2008; Colazos y Arias, 2015).

2.2.2. Requerimientos ambientales de *Oreochromis niloticus* y del sistema BFT

En los sistemas de acuicultura intensiva de tilapia, la calidad del agua es generalmente un factor limitante para aumentar los niveles de producción (Boyd, 2017). El mantenimiento y monitoreo de esta son claves en el éxito en los ciclos de cultivo, la práctica más común para garantizar la buena calidad del agua y eliminar constantemente los metabolitos tóxicos, es el uso de diversos tipos de filtros o bien se recurre a recambios constantes de agua para disminuir o eliminar los residuos y alimento que no se aprovecha (Ingle et al., 2003; Bautista y Velazco, 2011).

En los sistemas BTF algunos de los parámetros que primordialmente deben ser monitoreados son el oxígeno disuelto (OD), pH, salinidad, alcalinidad, sólidos sedimentables y nitrógeno total amoniacal (TAN) (Araiza y Rodríguez, 2019). El mantenimiento de dichos parámetros en intervalos óptimos se verá reflejados en el buen crecimiento de los organismos y la disminución de las mortalidades (Emerenciano et al., 2017). En este sentido, muchos investigadores coinciden en que utilizando la tecnología BFT, la calidad del agua de cultivo se puede mantener en el nivel recomendado para el cultivo de la especie (Tabla 1), sin necesidad de reemplazarla diariamente como en los sistemas convencionales. (Wasielesky et al., 2006; De Schryver et al., 2008; Avnimelech, 2015; Ekasari et al., 2015; Lima et al., 2015).

Tabla 1. Parámetros de calidad del agua para cultivo de tilapia en BFT y sus intervalos recomendados para el cultivo de la especie (Modificada de Emerenciano et al., 2017)

Parámetro	**Intervalo óptimo**
Sólidos sedimentables	Entre 5 y 50 ml L^{-1}
Temperatura	Óptima 25-30 °C
pH	6.8 – 8.5
Oxígeno disuelto	Mayor a 4.0 mg L^{-1}
Alcalinidad	Entre 100 y 150 mg L^{-1}
TAN	Menor a 1 mg L^{-1}
Nitritos	Menor a 1 mg L^{-1}
Nitratos	0.5-20mg L^{-1}

Con relación al pH, López et al. (2014), mencionan que un pH alto beneficia el dominio del ion amonio (NH_3), por lo que se debe monitorear constantemente para garantizar el intervalo de pH óptimo para tilapia, el cual se encuentra entre 6.5 y 8.5 (Emerenciano et al., 2017). Existe una alta correlación entre el pH y la alcalinidad, esta debe ser mantenida entre 100 y 150 mg L^{-1} de $CaCO_3$ (Hargreaves, 2013), lo que permitirá garantizar las necesidades metabólicas de las bacterias heterotróficas, quienes para remover 1mg de amonio requieren 4 mg de OD y 3.7 g de alcalinidad, produciendo como resultado sólidos sedimentables (Collazos y Arias, 2014). Si la alcalinidad disminuye demasiado el pH puede caer abruptamente, inhibiendo las funciones bacterianas, propiciando así aumentos en los compuestos nitrogenados (Hargreaves, 2013). De lo anterior se desprende que la alcalinidad es un parámetro limitante para la formación de bioflóculos.

La temperatura del agua afecta al pH teniendo correlaciones positivas (Galvez et al., 2022). Esto significa que cuanto mayor es la temperatura, mayor es el pH y el amonio tóxico (De Schryver et al., 2008). La temperatura del agua en un estanque de biofloc no es un factor que pueda regularse fácilmente sin agregar costos operativos adicionales significativos, especialmente en estanques al aire libre. Las condiciones ambientales van a establecer la temperatura de trabajo, una temperatura intermedia del agua entre 25 y 30 °C se considera óptima para obtener bioflóculos estables (Emerenciano et al., 2017).

En BFT, los sistemas de incorporación de oxígeno al agua y la constante aeración son fundamentales para proveer necesidades básicas como: a) Respiratorias tanto del pez cultivado como de los microorganismos presentes en el sistema; b) Las reacciones necesarias para la metabolización de los compuestos nitrogenados; c) Mantener los flóculos suspendidos en la columna de agua y evitar la acumulación de materia orgánica en el fondo (Collazos y Arias, 2015; Hernández et al., 2019). Se recomienda una saturación de oxígeno superior a 4.0 mg L^{-1} para garantizar el crecimiento de los peces y el buen funcionamiento del sistema (Emerenciano et al., 2017).

Otro parámetro igualmente importante son los sólidos sedimentables, los cuales, en exceso pueden incrementar el consumo de oxígeno en el sistema (Hargreaves, 2013). Además, pueden llegar a tapar las branquias y limitar el intercambio de oxígeno, provocando la muerte de los organismos o inhibiendo su crecimiento (Luo, et al., 2014). El intervalo óptimo para alevines se encuentra entre 5 y 20 ml L^{-1}, mientras que para juveniles y tilapias adultas se encuentra entre 20 y 50 ml L^{-1} (Avnimelech, 2015).

Respecto a los niveles de compuestos nitrogenados, como ya se mencionó anteriormente, estos se encontrarán regulados por las comunidades de bacterias quimio autótrofas, bacterias heterotróficas y grupos planctónicos (Hargreaves, 2013; Choo y Caipang 2015). Estos reducen los niveles de dichos compuestos a través de eliminación de nitrógeno amoniacal por nitrificación (Araiza y Mujica, 2019). Este proceso consiste en la oxidación sucesiva de amoníaco primero a nitrito y finalmente a nitrato (Collazos y Arias, 2015). Valores superiores a los intervalos óptimos (principalmente TAN y nitrito) pueden verse reflejados en mortalidades elevadas (Furtado et al., 2015).

Dentro de los distintos grupos microbianos abundantes en el sistema BFT que participan en la mejora de la calidad del agua (Emerenciano et al., 2017), por un lado, se encuentran las bacterias heterótrofas las cuales tiene la capacidad de metabolizar los desechos provenientes tanto de excretas como de alimento no consumido, disminuyendo los compuestos nitrogenados, principalmente las formas más toxicas (amoniaco, NH_3) (Hernández et al., 2019).

Dichas bacterias reutilizan la abundante materia orgánica presente en el sistema como fuente de energía y el nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana (Mendoza et al., 2017). En comparación con las bacterias nitrificantes autótrofas, las bacterias heterótrofas son más eficientes en la remoción de compuestos nitrogenados debido a que incrementan sus poblaciones mucho más rápido en aguas con alto contenido de materia orgánica y alta oxigenación (Monroy et al., 2015).

Por otro lado, distintos autores mencionan a nematodos y algunos grupos del zooplancton como coadyuvantes en la remoción del nitrógeno (Pérez et al., 2009; Monroy et al., 2013), que en conjunto los distintos grupos microbianos consiguen el control casi absoluto de estos compuestos nitrogenados. De acuerdo con Ebeling et al. (2006), la formación y desarrollo de flóculos en altas relaciones C/N, se encuentra directamente relacionada con la asimilación de los compuestos nitrogenados y la presencia de organismos zooplanctónicos.

Además de las bacterias y protozoarios, se reconocen a las microalgas como mediadores de la calidad del agua, las cuales utilizan amoníaco y compuestos como nitrito y nitrato para la construcción de proteínas y azúcares, igualmente proporcionan oxígeno y capturan dióxido de carbono (Moss, 2002).

De igual manera, se ha observado que el biofloc brinda a los organismos en cultivo efectos inmunoestimulantes y mejora de la capacidad antioxidante (Adineh et al., 2019). Esto puede atribuirse a los múltiples componentes microbianos y compuestos bioactivos en los flóculos (flagelina, lipopolisacáridos, β-glucanos, ácidos teicoicos, enzimas antioxidantes etc.) que pueden estimular la respuesta inmunitaria de peces o crustáceos y en consecuencia aumentar su capacidad de protección contra las enfermedades (Abakari et al., 2022).

2.2.3. Fuente orgánica de carbono

Las fuentes de carbono son los sustratos para el funcionamiento de los sistemas BFT, por lo tanto, para el desarrollo de la comunidades heterótrofas y la generación de energía se necesita agregar fuentes de carbono adicionales (Abakari et al., 2021). Su elección dependerá de factores como el costo, la abundancia local y una óptima asimilación bacteriana (De Schryver et al., 2008).

Las fuentes de carbono suelen ser subproductos de la industria alimentaria para humanos y/o animales, siendo la melaza la más ampliamente utilizada (Crab et al., 2009; Asaduzzaman et al., 2010). Históricamente se han utilizado diversas opciones como sacarosa (Zhao et al., 2012), glicerol y acetato (Crab et al., 2010), harina de arroz (Castro et al., 2017) y harina de maíz (Asaduzzaman et al., 2010), es de suma importancia adicionar la fuente de carbono para mantener una alta relación C/N y promover así la formación de bioflóculos (Avnimelech, 2015).

2.3 Tilapia del Nilo (Generalidades de la especie)

La tilapia del Nilo (*O. niloticus*) es una de las especies más cultivadas debido a que presenta gran tolerancia a las variaciones ambientales, lo que le permite desarrollarse en aguas poco oxigenadas, dulce o salada, tiene un crecimiento rápido, alta capacidad reproductora y adaptación para vivir en condiciones de cautiverio, así como en altas densidades de cultivo, además de brindar una carne de excelente calidad nutricional, buen sabor, poca espina y de precio accesible (Oso et al., 2006). Es un pez originario de

África, actualmente distribuido en América, Sudeste Asiático, algunos países de Europa e incluso en Australia (Basualdo et al., 2012).

2.3.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la tilapia está sujeta a continuos cambios, esto se debe principalmente a la similitud y el solapamiento de sus características morfológicas, y también al hecho de que muchas especies de tilapia se hibridan libremente en la naturaleza (El Sayed, 2006; Naturalista, 2022).

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Clase Actinopterygii

Orden: Perciformes (Bleeker, 1859)

Familia: Cichlidae (Heckel, 1840)

Género: *Oreochromis*

Especie: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

2.3.2 Características morfológicas

2.3.3 Morfología externa

El cuerpo de la tilapia es generalmente comprimido y discoidal, raras veces alargado, la forma predominante de la boca es ancha, a menudo bordeada por labios gruesos, se caracterizan por la presencia de una línea lateral claramente visible, así como de barras verticales, con colores relativamente tenues y con poco contraste sobre los colores del cuerpo, lo que les proporciona cierta habilidad para cambiar su color en respuesta al estrés, controlando los cromatóforos de la piel (El Sayed, 2006; INAPESCA, 2018).

Poseen órganos sensitivos relativamente grandes, aportando al pez una excelente capacidad visual, para su locomoción poseen aletas pares, representadas por las pectorales y ventrales e impares, constituidas por aletas dorsales, caudales y aleta anal

(INAPESCA, 2018). Las aletas dorsal y anal son cortas, cuenta con numerosas espinas y la parte terminal de radios suaves, disponiendo sus aletas dorsales en forma de cresta, la aleta caudal redondeada, trunca y en ocasiones acortada, la cual es empleada para mantener el equilibrio del cuerpo durante la natación (Cantor, 2007) (Figura. 1).

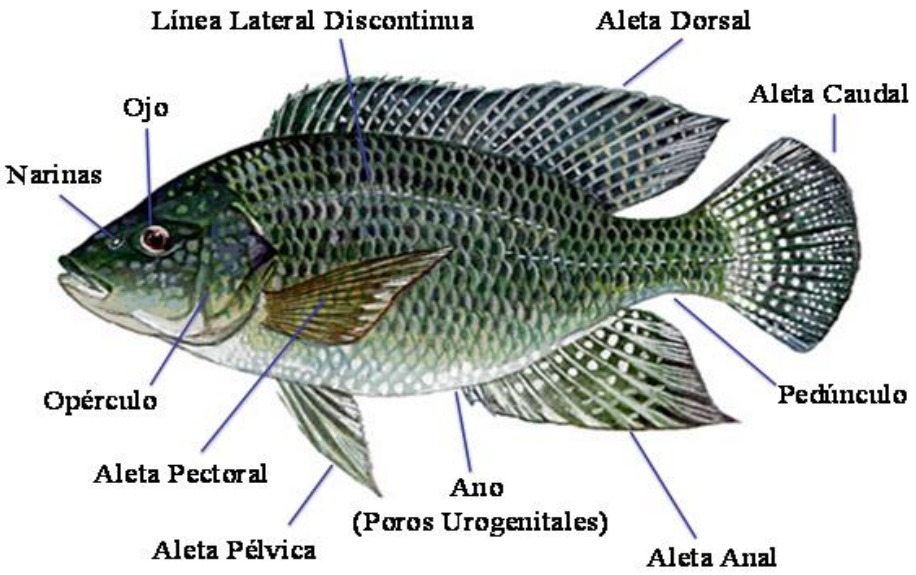

Figura. 1. Morfología externa de *Oreochromis niloticus* (Basualdo-Ramírez et al., 2012)

2.3.4 Morfología interna

El sistema digestivo de *O. niloticus* inicia en la boca, presenta, piezas dentales mandibulares ya sea unicúspides, bicúspides o tricúspides, continuando por el esófago hasta el estómago, el intestino tiene la forma de un tubo redondo y hueco que se estrecha justo detrás del píloro (Cantor, 2007).

Incorporado al tracto digestivo, se encuentran dos glándulas muy importantes, el hígado y la vesícula biliar junto con el riñón se consideran creadores de sustancias químicas y órganos de almacenamiento y excreción, estas glándulas anexas regulan parte importante del equilibrio químico corporal (Morales, 2003). El hígado es un órgano grande y alargado con una estructura pequeña, redonda y verde en la parte superior llamada vesícula biliar, que se comunica con los intestinos a través de un pequeño tubo llamado conducto biliar (López et al., 2013). El riñón es un filtro ovalado con un glomérulo, por el cual fluye la

sangre mediante tubos hasta los uréteres, que se descargan en la vejiga y posteriormente secretan al exterior (Figura. 2) (Cantor, 2007).

El intestino es un órgano de suma importancia ya que colabora con la digestión y absorción de alimentos, también es fundamental para el equilibrio hidroeléctrico y regulación endocrina, así mismo constituye a un sitio inmunológico importante que actúa como barrera de defensa física y química contra agentes patógenos que entran a su organismo ya sea por medio de la alimentación o por medio de la ingestión de agua circundante (Morales, 2003).

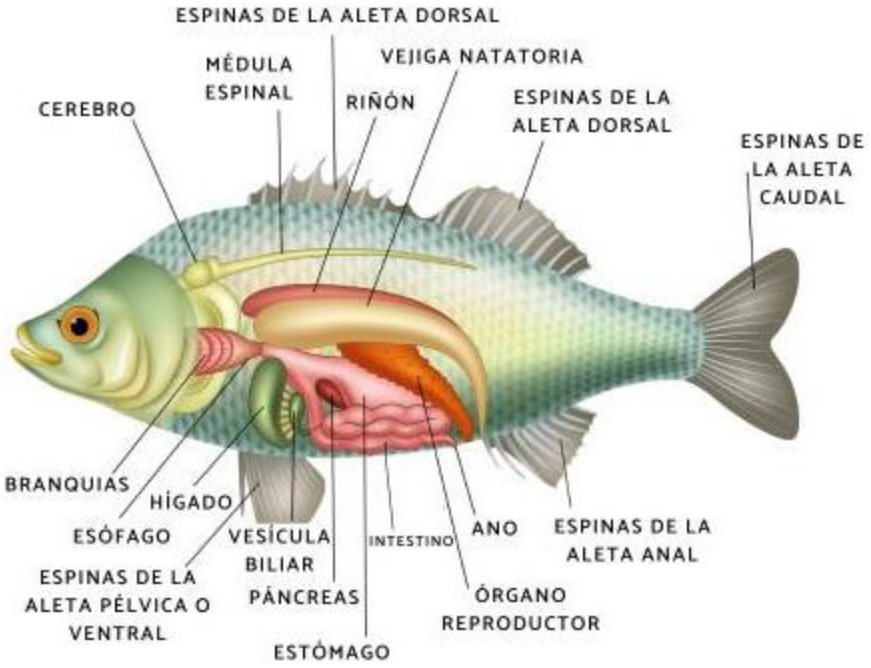

Figura. 2. Morfología interna de *Oreochromis niloticus* (Cantor, 2007)

2.4. Enfermedades comunes en tilapia

Pese a ser una especie altamente resistente, no está exenta de ser susceptible a distintas enfermedades que afectan el cultivo exitoso de la especie. Existen enfermedades ampliamente conocidas, así como enfermedades emergentes, la mayoría relacionadas con la intensificación de los métodos de cultivo, suelen ser causadas por factores de estrés como la mala calidad del agua, cambios bruscos en los parámetros físicos y químicos, manejo inadecuado de los animales, variaciones en la temperatura del agua de

cultivo y deficiencias nutricionales entre otros (Fajer et al., 2017). Esto genera estrés y disminución del sistema inmune llegando a producir grandes mortalidades a corto tiempo (El Sayed, 2006;).

Entre algunos de los agentes causantes de enfermedad en la tilapia se encuentran: bacterias, parásitos y hongos. Respecto a las enfermedades bacteriana, destaca la estreptococosis, que presenta como característica principal la aparición de granulomas que afectan al bazo, el hígado y el riñón con un exudado purulento en el tejido muscular. A demás puede provocar desorientación y nado errático, exoftalmia, opacidad en la córnea y hemorragia periocular. El agente causal es *Streptococcus iniae* (coco Gram positivo), se considera un problema de salud pública pues esta reportado que afecta al hombre (Brunt et al., 2007).

En cultivos intensivos recurrente el desarrollo de septicemia hemorrágica la cual está ligada a, exceso de materia orgánica y bajos niveles de oxígeno disuelto en el agua lo que beneficia la proliferación de *Aeromonas hydrophila* (cocobacilo motil anaerobio facultativo, Gram negativo), esta enfermedad infecta a los peces por ingestión, provocando grandes mortalidades y pérdidas, se caracteriza por úlceras en la piel, necrosis tisular y sangrado alrededor de las branquias, órganos internos y el ano. (Rodríguez et al., 2005).

Otro patógeno frecuente en los cultivos de tilapia es *Flexibacter columnaris (*bacteria Gram negativa)*,* el cual es causante de la columnaris es, que generalmente aparece como una de las secuelas del estrés en los peces inducido por fluctuaciones en la temperatura del agua y elevadas concentraciones de amoniaco, se caracteriza por la presencia lesiones necróticas poco profundas, de color blanquecino-grisáceo a blanquecino-amarillento, localizadas a nivel de las aletas, cabeza y/o cuerpo, las branquias también son afectadas y muestran signos de palidez y necrosis (El Sayed, 2006).

También se ha descrito al género *Mycobacterium* como patógeno en los cultivos de tilapia, bacterias Gram positivas son los agentes causales de la mycobacteriosis la cual se describe como una enfermedad sistemática, crónica y progresiva con signos clínicos que incluyen decoloración de la piel, falta de apetito, letargo, natación errática, ulceraciones o erosiones cutáneas, crecimiento reducido, exoftalmia, pequeños granulomas y nódulos grises o blancos en órganos internos, e hipertrofia de bazo, riñón e hígado, la enfermedad

causada por los géneros bacterianos de esta especie es conocida como la tuberculosis de los peces y algunas cepas están asociadas con infecciones en humanos (Lara et al., 2014).

Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas spp., son bacterias Gram negativas que también han sido reportas como oportunistas causantes de enfermedades en tilapia, de igual modo distintas cepas de *Vibrios* que son bacterias Gram negativas, se consideran oportunistas facultativos, forman parte de la microbiota intestinal de la tilapia, sin embargo, los peces desarrollan esta enfermedad cuando se exponen a condiciones estresantes (El Sayed, 2006).

Muchas de las bacterias antes mencionadas se ven favorecidas por lesiones provocadas por distintos parásitos como como; *Gyrodactylus, Ichthyophthirius* (Monogenéo), *Chilodonella sp*., *Ichthyophthirius multifiliis, Trichodina spp, Ichthyobobo sp* (protozoos Ciliados), *Centrecestus. Formosanus* (helminto), así como algunos otros flagelados y crustáceos que normalmente se desarrollan en estanques con altas densidades de cultivo (Fajer et al., 2017).

Respecto a las enfermedades fúngicas, la saprolegniosis, es la enfermedad más común y va frecuentemente asociada con una infección bacteriana simultánea, la enfermedad se caracteriza por la presencia de lesiones en aletas, cavidad bucal y piel, las cuales son cubiertas por una masa de aspecto algodonoso y de un color blanquecino, blanquecino-grisáceo, o amarillento, correspondiente al micelio del hongo *Saprolegnia spp*. (El Sayed, 2006).

Una de las enfermedades que ha adquirido notoriedad a nivel mundial, es el virus de la tilapia del lago (TiLV), es una enfermedad viral emergente causada por un virus de la familia Orthomyxoviridae (Eyngor et al., 2014). Si bien, este patógeno no genera problemas de salud pública, tiene la capacidad de diezmar la producción de tilapia a nivel mundial, actualmente se ha reportado en países productores como Ecuador, Colombia, Israel, Egipto, Tailandia, Malasia, China y Filipinas, México y otros países están catalogados en el mapa de posible distribución del TiLV, aún se encuentra en desarrollo un método idóneo de identificación y contención (OIE, 2017).

2.5 Sistema inmune de peces óseos

En los peces óseos la inmunidad se lleva cabo a través de dos mecanismos: inmunidad innata e inmunidad adquirida, esta última se considera que es poco eficiente, ya que los peces al ser organismos poiquilotérmicos (de sangre fría), dependen fuertemente de la respuesta innata por lo que esta última se considera más fuerte en peces (Lizárraga et al., 2018). Cabe desatacar que otros grupos de peces como lampreas o mixines únicamente presentan inmunidad innata (Rubio-Godoy, 2010). En consecuencia, esta inmunidad está influenciada por diversos factores internos y externos (Biller y Urbinati, 2013).

Respecto a las diferencias entre peces y el sistema inmunitario de los mamíferos, una de las más marcadas es la ausencia de medula ósea y ganglios linfáticos, considerándose en los peces óseos al timo, riñón y bazo como análogos (Tabla 2). Por otro lado, las investigaciones más recientes, consideran al microbioma (conjunto formado por los microorganismos en un nicho ecológico especifico), como un nuevo órgano/tejido y lo destacan por las diversas funciones relacionadas con la respuesta inmune en las que participa (Barko et al., 2018; Sebastián y Sánchez, 2018).

El microbioma de los peces comprende una comunidad diversa de protistas, levaduras, virus, bacterias y arqueas, que habitan la piel, las branquias y el tracto gastrointestinal (GI) y se ven influenciados por diversos de factores como la temperatura del agua, la estacionalidad, la genética del propio pez y la dieta (Merrifield y Rodiles, 2015). El estudio de la inmunidad o respuesta inmune en peces se ha incrementado en los últimos años debido a que las pérdidas en producción acuícola generadas por las infecciones en los organismos en cultivo tienen un impacto económico significativo (Olabuenaga, 2000; Rubio-Godoy, 2010).

En cuanto a los factores internos (dependientes del organismo en sí), pueden ser la edad, el estado nutricional, el estrés, los niveles hormonales y los ciclos de maduración sexual (Vega et al., 2010). Respecto a los externos (atribuibles al medio ambiente), se pueden mencionar a la temperatura, la salinidad, el pH, el nivel de oxígeno, la carga orgánica de contaminantes en el agua y la manipulación de los organismos (Ruiz et al., 2003).

Tabla 2. Principales órganos del sistema inmune en peces óseos y sus funciones (Fernández et al., 2002a; Vega et al., 2010; Barko et al., 2018).

Órgano	**Función relacionada a la inmunidad**
Timo	Su principal función es la diferenciación y selección de linfocitos T.
Riñón	Contiene un gran número de macrófagos y de linfocitos B, debido a su gran capacidad hematopoyética se le considera como un análogo de la médula ósea de los mamíferos.
Bazo	Tiene funciones semejantes a las del riñón con énfasis en la presentación de antígenos y la inducción de la respuesta inmune adaptativa.
Tejido linfoide asociado a mucosas o intestino (MALT y GALT)	Se considera tejido con importantes funciones defensivas, está conformado por diferentes tipos celulares asociados a la respuesta inmune como; linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y algunos tipos de granulocitos.
Microbioma	Participa en la señalización endocrina, prevención de la colonización de microorganismos patógenos y regulación de la función inmunológica.

2.5.1 Respuesta inmune innata

La respuesta innata incluye todos componentes presentes en el cuerpo antes de la aparición del agente patológico, entre estos componentes se encuentra la piel como una barrera física, el sistema de complemento, enzimas antimicrobianas, Interleucinas, el interferón y células, tales como granulocitos, monocitos, macrófagos, y células citotóxicas no específicas (NCC) (Biller y Urbinati, 2013).

Así mismo, este mecanismo de defensa se caracteriza por presentar una serie de receptores de reconocimiento de patrones codificados en la línea germinal que reconocen dos tipos de patrones moleculares: 1) los asociados a patógenos (PAMPs) como las glicoproteínas y lipopolisacáridos (LPS) bacterianos y fúngicos, el ADN bacteriano, el ARN viral y otras moléculas que no se encuentran regularmente en la superficie de los organismos multicelulares; y por otro lado; 2) patrones moleculares del huésped que surgen como resultado de daño tisular por infección o traumatismo, cambios necróticos o muerte celular natural programada, pero que normalmente no se expresan en la superficie celular (Magnadóttir, 2006).

La respuesta innata está conformada por componentes celulares, humorales y tisulares, este sistema actúa como la primera línea de defensa frente a gran variedad de agentes externos, operando de manera inespecífica frente a moléculas tanto de origen antigénico o inmunogénico, en los invertebrados inferiores como los peces, la respuesta innata cobra relevancia debido a que la respuesta adquirida o especifica actúa de manera relativamente lenta tras una infección (Fernández et al., 2002a).

2.5.2 Barreras físicas

De acuerdo con Fernández et al. (2002), Rubio-Godoy (2010), y Vega et al. (2010), la piel, branquias e intestino, actúan constantemente como barreras de superficie contra parásitos, bacterias y hongos, mediante una serie de mecanismos que limitan la entrada de agentes patógenos, dichos mecanismo se encuentran presentes en el mucus que los recubre (Piera, 2022).

El mucus presenta diversas funciones: actúa a modo de barrera mecánica que mantiene la estabilidad interna y contiene sustancias biológicamente activas que ejercen como antimicrobianos y anti parasíticos, contiene péptidos antibacterianos, proteína C reactiva, lisozima, interferón, lectinas, piscidinas, transferrina y complemento, que constituyen una barrera de defensa química primaria (Vega et al., 2010). La integridad de la epidermis es de suma importancia para garantizar el equilibrio osmótico, así como para evitar el ingreso de cuerpos extraños, en los órganos antes mencionados también se ha descrito la presencia de células como linfocitos, macrófagos y células granulares eosinofílicas, todas ellas con actividad de defensa (Magnadóttir, 2006).

2.5.3 Componentes humorales

En peces la respuesta innata humoral funciona a través de varios componentes solubles en los fluidos corporales, esto incluye la producción de numerosos compuestos antibacterianos, proteínas de fase aguda, complemento activado por vía alterna y diversas citocinas (Lin et al., 2011). Dichos componentes se describen a continuación;

Los péptidos antibacterianos identificados en peces aún se consideran pocos en comparación con otras clases de vertebrados, además de actuar sobre agentes patógenos como bacterias, hongos virus y protozoarios, participan en la respuesta inflamatoria y en el incremento de la actividad fagocítica (Vega et al., 2010). Rubio-Godoy (2010), menciona que algunos de los componentes antes mencionados se pueden localizar en el plasma o suero sanguíneo, a partir del cual también se pueden transportar hacia la superficie del pez.

Respecto a los compuestos antibacterianos, uno de los más importantes en peces es la lisozima, de la cual se conoce su capacidad para lisar distintos enlaces presentes en las paredes celulares de algunas bacterias, también presenta actividad inhibidora y letal sobre virus, hongos y parásitos, y se encuentra distribuida de manera abundante en los organismos (Song et al., 2022). Sin embargo, la cantidad de lisozima en suero y tejidos es variable entre especies, así mismo, la temperatura influye en su abundancia, viéndose disminuida en bajas temperaturas (Pirarat et al., 2010).

Los componentes humorales son predominantemente proteínas, de entre las más importantes se encuentra la proteína C reactiva y la transferrina (Fernández et al., 2002; Olabuenaga, 2000). Respecto a la proteína C reactiva, esta es una proteína sérica de fase aguda presente en procesos infecciosos, su concentración aumenta abundantemente tras la exposición a endotoxinas bacterianas, es una globulina del plasma que específicamente en peces se presenta de forma constante en el suero, favorece la acción del complemento, la fagocitosis, y dificulta el crecimiento bacteriano (Álvarez, 2008).

En cuanto a la transferrina está se considera como un como un activador de macrófagos e inhibidor del crecimiento bacteriano al secuestrar el hierro presente en la sangre, limitando la disponibilidad de este para las bacterias patógenas (Olabuenaga, 2000). Esta glicoproteína presenta polimorfismo, posiblemente como adaptación a la capacidad que han desarrollado bacterias patógenas para la obtención de hierro (Fernández et al., 2002).

Existen evidencias que indican que algunos fragmentos proteolíticos de la transferrina, son capaces de inducir la producción de óxido nítrico (NO), que es también un potente agente bactericida (Stafford y Belosevic*,* 2003).

Otras proteínas igualmente importantes son las lectinas, mismas que participan en la aglutinación de microrganismos y en la precipitación de compuestos solubles, tienen la capacidad de unirse a carbohidratos particulares presentes en las bacterias llamados adhesinas, impidiendo así su unión a células epiteliales, lo que beneficia la opsonización, fagocitosis y activación del complemento (Wang y Leung, 2000).

Por otro lado, el sistema de complemento es un mecanismo de defensa biológico que comprende unas 35 proteínas plasmáticas o séricas que forma parte de la respuesta innata (Rubio-Godoy, 2010). Tiene tres funciones defensivas primordiales: a) recubrir patógenos y partículas ajenas al cuerpo para facilitar su reconocimiento y destrucción por parte de las células fagocíticas (opsonización); b) iniciar las respuestas inflamatorias estimulando la contracción del músculo liso, la vasodilatación y la quimioatracción de leucocitos; y c) lisar patógenos mediante la perforación de sus membranas (Bonilla y Rondón, 2011). El complemento en peces, se encuentra principalmente en el suero y también en las secreciones del mucus (Poisa, 2008).

Su activación se puede dar por tres vías: la vía clásica (dependiente de anticuerpo), la vía alterna se induce por la presencia de lipopolisacáridos o polisacáridos de la pared celular de bacterias u hongos entre otros compuestos, y la vía de la lectina (Vega et al., 2010).

En cuanto a las citocinas, estas son moléculas que conforman una red que controla y coordina las respuestas de la inmunidad innata y adquirida, son proteínas de bajo peso molecular secretadas por células del sistema inmune como linfocitos y macrófagos, actúan en respuesta a patógenos, a sus productos u otras señales relacionadas(Pohlenz y Gatlin, 2013; Biller y Urbinati, 2014).

Las citocinas son de vida corta, muestran los atributos de pleiotropía (regulan distintas funciones), redundancia (varias citocinas realizan la misma función), sinergia (varias citocinas pueden producir un efecto que se potencia mutuamente) antagonismo (inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos) e inducción en cascada (Goldsby et al., 2004). Dicha cascada de transducción intracelular altera el patrón de expresión génica, de modo que producen una determinada respuesta biológica, por lo que la caracterización de los genes que codifican dichas citocinas, permite desarrollar tratamientos efectivos para

mejorar la resistencia de las especies, tanto frente a enfermedades infecciosas como a estrés abiótico (Rojas et al., 2012).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), es una citocina inflamatoria que tiene importantes efectos pleiotrópicos, incluyendo inflamación, apoptosis, proliferación celular y estimulación del sistema inmune, se considera como el principal mediador de la respuesta inmune ante infecciones producidas por bacterias Gram negativas, mientras que en mamíferos existen la forma α y β, en peces únicamente se presenta la forma α (Poisa, 2008).

Otra de las citocinas proinflamatorias es la interleucina (IL), su función es estimular a los linfocitos, aumentando su proliferación (Pohlenz y Gatlin, 2014). En peces la IL-1 inicia o aumenta la expresión de una gran cantidad de genes no estructurales, particularmente otras citocinas, que se expresan durante la inflamación y, además, participa en la proliferación y maduración de muchos tipos celulares inmunes (Poisa, 2008; Zou y Secombes, 2016). De acuerdo con Panigrahi et al. (2007), estas moléculas interactúan con células y receptores generando el mucus protector que media la respuesta inmune.

2.5.4. Componentes celulares

La inmunidad celular no específica comprende tres mecanismos defensivos: la inflamación, la fagocitosis y la citotoxicidad no específica (Poisa, 2008). Las células que participan en estos procesos incluyen 1).células fagocíticas móviles (macrófagos y neutrófilos), 2) células eosinofílicas granulares (EGC), que son menos móviles y están presentes en sitios mucosos como el intestino o las branquias, (análogas a las células cebadas, en mamíferos) y 3) las células citotóxicas no específicas (NCC) (Rubio-Godoy, 2010).

2.5.5. Inflamación

La inflamación también se considera un mecanismo innato de respuesta inmune (Biller y Urbinati, 2014). Una vez que un agente infeccioso ha penetrado en un tejido**,** el área

afectada recibe mayor irrigación sanguínea, seguida de un aumento en la permeabilidad capilar, lo que permite la migración de células de defensa, para mantener la homeostasis y proporcionando en el lugar de la lesión las condiciones necesarias para su mejoría (Olabuenaga, 2000)**.**

Los granulocitos son el primer tipo de célula en llegar al foco de la inflamación, siendo responsables de la destrucción de los patógenos (Rombout et al., 2011; Mokhtar y Abdelhafez, 2021). Por otro lado, las células patógenas restantes y los residuos celulares son fagocitados por macrófagos (Biller y Urbinati, 2014). Se ha observado migración de EGC durante los procesos inflamatorios, su presencia y desgranulación podría facilitar la liberación de leucocitos a la sangre y, en consecuencia, amplificar la respuesta inflamatoria (Praveen et al., 2006).

2.5.6. Fagocitosis y citotoxicidad no especifica

Dentro de la inmunidad innata, la fagocitosis es uno de los procesos más importantes en la defensa de los animales poiquilotermos, debido a que es el menos influenciado por la temperatura (Panigrahi et al., 2007). En este mecanismo están involucrados principalmente los macrófagos y neutrófilos, el proceso incluye las etapas de reconocimiento, unión, incorporación, destrucción y digestión del antígeno (Mokhtar y Abdelhafez, 2021) Otro de los mecanismos destructores observado en este tipo de respuesta es el estallido respiratorio, que auxilia a eliminar bacterias mediante la producción de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el ácido hipoclórico (Rubio-Godoy, 2010).

Del mismo modo, los macrófagos pueden producir óxido nítrico que puede formar potentes agentes bactericidas como peroxinitritos y grupos hidroxilos (Grayfer et al., 2018; Mokhtar y Abdelhafez, 2021). Respecto a las células citotóxicas no especificas (NCC) de los peces, han sido detectadas en bazo, riñón, fluido peritoneal y sangre periférica, y actúan frente a células infectadas por virus y protozoarios parásitos (Praveen et al., 2006).

2.6. Inmunidad adquirida

La inmunidad adquirida, se compone de células y procesos sistémicos altamente especializados para el reconocimiento de un elemento extraño, o antígeno y su eliminación en un subsecuente encuentro, mediante la memoria inmunitaria (Magnadóttir, 2006). Este tipo de inmunidad es activada por la respuesta inmune no especifica (Lieschke y Trede, 2009).

Aunque los componentes de la respuesta innata detectan los agentes patógenos invasores en el sitio de infección mediante sus receptores de reconocimiento de patrones, generando respuestas antimicrobianas y proinflamatorias que ralentizan la infección, también están iniciando la presentación de agentes patógenos a los linfocitos y ayudar a activar respuestas que generarán las fuertes respuestas mediadas por anticuerpos, y mediadas por células, específicas para antígeno, que resolverán la infección (Rauta et al., 2012).

En términos generales la inmunidad específica está compuesta por dos elementos: la respuesta humoral (involucra la producción de anticuerpos), la cual esta mediada por linfocitos B, y la respuesta celular, mediada por linfocitos T (Tosi, 2005; Salinas et al., 2011).

La respuesta adquirida se caracteriza por la memoria inmunológica, que conduce a una producción más rápida y pronunciada de anticuerpos tras una exposición secundaria al mismo antígeno (Stagaman et al., 2017). Dicha exposición conlleva la estimulación de un pequeño grupo de estos linfocitos que reconocen dicho antígeno mediante receptores específicos lo que provoca un cambio en esta población linfocitaria, de tal manera que en los sucesivos encuentros con el antígeno la respuesta es mayor y más rápida (Rubio-Godoy, 2010).

En los peces, los linfocitos constituyen la población mayoritaria de leucocitos, los linfocitos B son los responsables de la secreción de anticuerpos y se les han atribuido funciones fagocitarias tanto *in vivo* como *in vitro* en algunos estudios en teleósteos (Rauta et al*.,* 2012). Los linfocitos T son los responsables de la muerte celular y de la regulación de la actividad de otras células inmunocompetentes mediante la secreción de citocinas, ambas poblaciones celulares se localizan en tejidos como riñón, bazo intestino, corazón y sangre (Poisa, 2008).

En relación con el componente humoral, la producción de anticuerpos en peces ocurre de una forma análoga a la descrita en mamíferos, están presentes en los fluidos internos del pez y en todas las superficies mucosas (vía de entrada de la mayoría de los microorganismos y partículas no propias) (Uribe et al.,2011). Estas reaccionan frente a adhesinas bacterianas, dificultando así su entrada en el hospedero y pueden neutralizar muchas toxinas producidas por los patógenos (Biller y Urbinati, 2014).

Los peces óseos poseen complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y células T, dicho complejo codifica dos clases de distintas glicoproteínas, estructural y funcionalmente, que presentan péptidos antigénicos a células T, iniciando la respuesta inmune específica (Rauta et al., 2012; Mokhtar y Abdelhafez, 2021). El proceso se lleva a cabo mediante células presentadoras de antígeno (principalmente macrófagos), las cuales captan el antígeno y lo procesan para presentarlo en el contexto del CMH tipo II, a los receptores de antígeno de los linfocitos T, y de esta forma se activan (Ruiz et al., 2018).

Anteriormente en peces solo se conocía la presencia de inmunoglobulina IgM, sin embargo, en investigaciones más recientes se han reportado IgD, IgT e IgZ (Salinas et al., 2011). Dichos isotipos no han sido completamente caracterizados funcionalmente. Se conoce que IgD, probablemente funcione como receptor y únicamente se localiza en la membrana celular de células β (Hu et al., 2010). Por otro lado, la IgT se encuentra relacionada a una función antipatogénica en el intestino, la IgT se expresa como monómero en suero de trucha arco iris, y un tetrámero en mucosa intestinal (Zhu et al., 2013).

2.7. Estrés oxidativo

Se considera como estrés a aquella situación en la que un elemento potencialmente negativo puede alterar el equilibrio interno (homeostasis) de un organismo (Schreck y Tort, 2016; Carvajal, 2019).

Los peces se ven sometido a diversos factores estresantes los cuales se pueden dividir en factores físicos, como la competencia por recursos, espacio, manejo, transporte, captura, e incluso canibalismo (Ruiz et al., 2003), y en factores químicos, como la acumulación de productos de excreción en el agua de cultivo que tienen efectos tóxicos para el

organismo, acidificación del medio, cambios en la temperatura y escases de oxígeno (Martínez-Álvarez et a,. 2005). De tal modo que se han clasificado diversos tipos de estrés, nutricional, traumático, químico, social, térmico y estrés oxidativo (OS) (Hoseinifar et al., 2020).

El estrés oxidativo se define como la condición, en la que la concentración de sustancias prooxidantes es mayor a la de las antioxidantes, es decir se produce un desbalance, lo que conlleva a un desorden fisiológico en el organismo (Carvajal, 2019).

El elemento clave en esta condición es el oxígeno, dicho elemento es un compuesto necesario para todos los organismos aeróbicos, a partir de él obtienen la energía necesaria para satisfacer sus necesidades en la respiración celular (Hoseinifar et al., 2020). Además, no puede ser sintetizado ni ser sustituido por otro elemento, si bien es esencial puede llegar a ser toxico, ya que es un potente oxidante (Martínez-Álvarez et al., 2005; Chowdhury y Saikia, 2020).

Esto puede derivar en estrés oxidativo como parte del metabolismo aeróbico fisiológico normal que se producen en especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que también han sido clasificadas como radicales libres (FR, por sus siglas en inglés) (Birnie et al., 2017). Son moléculas reactivas basadas en O_2, como el radical anión superóxido (O_2-), el radical hidroxilo (OH), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ozono (O_3) (Hoseinifar et al., 2020).

Los niveles intracelulares elevados de ROS pueden causar efectos destructivos como hidroxilación del ADN, desnaturalización de proteínas, peroxidación de lípidos, apoptosis y, en última instancia, daño celular (Chowdhury y Saikia, 2020). Los tejidos que acumulan más daño son los de mayor actividad metabólica, que en el caso de los peces son el hígado, riñón y branquias (Biller y Urbinati 2018; Hoseinifar et al., 2020).

Estas moléculas se equilibran mediante un sistema de defensa antioxidante, el cual se divide en mecanismos endógenos y exógenos, de dos tipos, enzimáticos y no enzimáticos (Birnie et al., 2017). Respecto a los endógenos tres de las principales fuentes antioxidantes son las enzimas superóxido dismutasa (SOD) actúa sobre el anión superóxido, catalasa (CAT), desactiva el peróxido de hidrogeno reduciéndolo a agua y oxígeno gaseoso al igual que glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Hoseinifar et al., 2020). Mientras que los mecanismos no enzimáticos incluyen antioxidantes de bajo peso molecular como el α-tocoferol (vitamina-E), β-caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico

(vitamina C), micronutrientes (selenio) y compuestos fenólicos, como flavonoides y poliflavonoides, todos ellos pueden ser suministrados mediante la dieta (Carvajal, 2019).

Si bien, se sabe que el estrés oxidativo limita la respuesta inmunitaria, con un deterioro de los compuestos de defensa en un intento de disminuir la producción de ROS (Biller y Urbinati 2018). Muchas de las moléculas ROS y los FR se consideran esenciales en la defensa del organismo, como potentes bactericidas que actúan activamente en la destrucción de patógenos invasores (Chowdhury y Saikia, 2020). Inducen la constante activación de granulocitos, macrófagos y células dendríticas con producción permanente de ROS debido a la actividad de estallido respiratorio de los leucocitos (Rubio-Godoy. 2010). Así como a la consiguiente activación de los compuestos de defensa innatos, como la síntesis de proteínas del sistema del complemento y la expresión de proteínas de adhesión en leucocitos (Fernández et al., 2002; Rubio-Godoy, 2010; Carvajal, 2019).

2.8. Probióticos en acuicultura

El empleo de microorganismos probióticos se ha incrementado en la acuicultura (Chauhan y Singh, 2019). Una definición de probiótico acorde con la actividad acuícola es la mencionada por Balcázar et al. (2006), quienes los definen como: “suplemento alimenticio compuesto de microorganismos vivos, los cuales se deben suministrar en densidades y medios adecuados, para que produzcan efectos benéficos en el hospedero, modificando la comunidad microbiana asociada a este o al ambiente de cultivo, asegurando el uso del alimento o incrementando su valor nutricional, mejorando la respuesta hacia las enfermedades o la calidad del ambiente; y todo ello repercutiendo en un mayor crecimiento y supervivencia de los animales en cultivo” (Verschuere et al., 2000; Monroy-Dosta et al., 2013).

Tradicionalmente las bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus casei, Lactobacillus. farciminis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus* y bacterias del género *Bacillus* como *Bacilluscereus var. toyoi, Bacilluscereus licheniformis, Bacilluscereus subtilis*, y *Bacilluscereus megaterium* han dominado la producción y administración en organismos terrestres y se han utilizado ampliamente en organismos acuáticos (Pandiyan *et al*., 2013).

Sin embargo, en acuicultura existe una diversidad de microorganismos (bacterias y levaduras) que han sido considerados como potenciales probióticos, como los pertenecientes a los géneros *Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Debaryomyces, Saccharomyces*, *Weisella, Vagococcus, Rhodotorula, Rhodococcus, Micrococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Vibrio, Carnobacterium, Shewanella, Aeromonas* (Chauhan y Singh, 2019). Si bien algunos de estos taxones han sido asociadas a patógenos, solo ciertas cepas y en ciertas condiciones lo son, donde muchos de estos han sido aislados directamente del organismo en cultivo (Austin y Austin 2012; Newaj *et al.,* 2014).

Dentro de los mecanismos de acción que llevan a cabo estos microorganismos se encuentra su capacidad de modular la respuesta inmune innata mediante la expresión de genes proinflamatorios y anti-inflamatorios así como la expresión de receptores en la mucosa que disparan la respuesta inmune inespecífica (Caipang et al*.,* 2012; Falco et al., 2012). Además, aumentan los niveles de células y proteínas relacionadas con la inmunidad inespecífica, y producción de sustancias antimicrobianas frente a organismos patógenos (Gómez y Balcazar, 2008). Así mismo los microrganismos probióticos han demostrado la capacidad de modular la actividad antioxidante en respuesta al estrés oxidativo (Pacheco et al., 2012; Ringo et al., 2020). En la tabla 3, se muestran algunas cepas empleadas en *O. niloticus* y el efecto producido en parámetros de la respuesta inmune innata.

Por otro lado, los microorganismos probióticos ayudan a mantener la calidad del agua de cultivo, al producir oxígeno y consumir CO_2 y materia orgánica residual, así como participar en la remoción, transformación o asimilación de nutrientes como el nitrógeno o fosforo (Pérez et al 2020; Mohammadi et al., 2021).

Tabla 3. Cepas probióticas y su efecto sobre la inmunidad de *Oreochromis niloticus*

Cepa	Fuente	Efecto	Referencia
Bacillus. pumilus	Peces cultivados	Incremento en la actividad fagocítica y los niveles de aniones superóxido, indican una resistencia más efectiva frente a estreptococosis	Srisapoome y Areechon, (2017)
L. acidophilus	No especificado	Incrementa la actividad de lisozima y mejora en adherencia de neutrófilos, así como resistencia contra patógenos	Aly et al. (2008)
L. rhamnosus	Humanos	Incremento de linfocitos intraepiteliales, granulocitos acidofilicos, y aumento en la actividad del complemento y TNFα e IL-1.	Pirarat et al. (2011)
P. acidilactici	Laboratorio	Aumento en los niveles séricos de lisozima y leucocitos, efecto competitivo en intestino	Ferguson et al. (2010)
B. subtilis	Soya	Mejoró la capacidad antioxidante total, la actividad de lisozima sérica, y fosfatasa alcalina, la superóxido dismutasa y la catalasa	Tang et al. (2017)
L. plantarum AH 78	Ambiente marino	Observó una regulación significativa de la expresión de los genes de citocinas, IL-4, IL-12 e IFN-γ	Hamdam et al. (2016)

2.8.1. *Rhodotorula*

El género *Rhodotorula* es común en varios ambientes y se ha aislado del suelo, la hierba, el agua dulce y salada, los alimentos (leche, jugos de frutas), la piel humana y las heces, se ha informado como parte de la microbiota normal de los cultivos de peces silvestres y de piscifactoría (Gatesoupe 2007; Kot et al., 2016; Gerelmaa et al., 2018; Chen et al., 2019). Las cepas pertenecientes a este género se han utilizado en la acuicultura para promover la respuesta inmune, la capacidad antioxidante, la resistencia a las enfermedades y aumentar la pigmentación en especies como el salmón, el pepino de mar y la tilapia (Ueno et al., 2011; Wang et al., 2015; 2019).

Además, *Rhodotorula* se ha utilizado para aumentar el valor nutricional de los alimentos vivos en la acuicultura como los cladóceros (Khudyi et al. 2018). También son capaces de utilizar muchos compuestos como fuentes de carbono, glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, etanol, glicerol, y hexadecano (Navarrete y Tovar 2014; Kot et al., 2016; Gerelmaa et al., 2018). Es una buena fuente de lípidos, enzimas, vitaminas, manano-oligosacáridos (MOS) y carotenoides (β-caroteno, toruleno y torularhodina) (Bhosale 2004; Kot et al., 2016; Gerelmaa et al., 2018), y es muy valorada en la industria farmacéutica, (Bhosale et al., 2002), cosmética (Anunnciato y Rocha, 2012), alimentaria y de pellets, así como en medicina (Saenge et al., 2011; Hernández et al., 2014), no sólo como precursores de la vitamina A, sino también por su coloración, propiedad antioxidante, posible actividad inhibidora de tumores y potenciación de la respuesta inmune que conduce a la protección contra las infecciones por bacterias y hongos (Bhosale 2004; Hernández et al., 2014; Kushniryk et al., 2015).

2.8.2. *Rhodotorula glutinis*

La levadura *Rhodotorula glutinis* es un microorganismo unicelular eucariota, aeróbico, se caracteriza por colonias rosadas, lisas de apariencia húmeda, exhiben una coloración característica que depende del tipo de cepa y condiciones de crecimiento (Kot et al., 2016; Gerelmaa et al., 2018; Ge et al., 2021). Pueden ser de color crema, amarillo, color salmón, rosa, naranja, coral y rojo sangre, dicha coloración se debe a la producción de grandes cantidades de carotenoides (Schafberg et al., 2020), además son ampliamente

conocidas como una buena fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y antioxidantes (Ge et al., 2021), su clasificación taxonómica se describe a continuación (Naturalista 2024; NCBI 2024):

Reino Fungi

Filo Basidiomycota

Subfilo Pucciniomycotina

Clase Microbotryomycetes

Orden: Sporidiobolales

Familia: Sporobolomycetaceae

Género: *Rhodotorula*

Especie: *Rhodotorula glutinis* (Harrison, 1928)

Las células son esféricas, elipsoidales o de forma alargada, se reproduce asexualmente por gemación multilateral o polar, son capaces de utilizar muchos compuestos como fuentes de carbono, tales como glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, etanol, glicerol y hexadecano (Navarrete y Tovar 2014; Kot et al., 2016; Gerlmaa et al., 2018).

Dicho género es común en diversos ambientes y han sido aisladas en suelo, hierba, agua dulce y salada, alimentos (leche, jugos de frutas), piel humana y heces, ha sido reportado como parte de la microbiota normal de peces tanto silvestres como de cultivo. (Gatesoupe, 2007; Monroy et al., 2013; Chen et al., 2019).

Cepas pertenecientes a este género han sido empleadas en acuicultura para promover la respuesta inmune, la capacidad antioxidante, la resistencia a enfermedades e incrementar la pigmentación en especies como salmón, pepino de mar y tilapia (Ueno et al., 2011; Wang et al., 2015; Wang et al., 2019). Así como para incrementar el valor nutricional del alimento vivo para acuicultura, como en el caso de los cladóceros (Khudyi et al., 2018).

3. Antecedentes

3.1 Probióticos en acuicultura

De entre los primeros antecedentes respecto al uso de probióticos en acuicultura se encuentra el trabajo realizado por Ringo y Gatesoupe (1998), quienes indicaron que los géneros *Streptococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* y *Carnobacterium* pertenecen a la microbiota intestinal normal de los peces y que dichos géneros de bacterias acido lácticas pueden actuar como antagonistas de bacterias patógenas, además mencionan que dichos géneros son productores de bacteriocinas, lo que reduce la necesidad de utilizar antibióticos.

En la última década las investigaciones en la que se involucra el uso de probióticos se han incrementado considerablemente, entre estos se encuentran el de;

Mantilla et al. (2016), donde evaluaron el crecimiento y supervivencia de larvas de *Oreochromis sp.* utilizando una levadura con características probióticas adicionada en el alimento y reportaron mejores resultados para variables de crecimiento y supervivencia en tratamientos con concentraciones de 10^6 y 10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) ml^{-1}, respecto a un tratamiento con una concentración menor de probiótico y sin la adición de probiótico.

En un estudio realizado por Gutiérrez et al. (2016), evaluaron distintos parámetros como, supervivencia, ganancia de peso y talla en alevines de tilapia alimentados con una dieta adicionada con probióticos micro encapsulados (*Bacillus megaterium, B. polymyxa* y *Lactobacillus delbueckii*) corroborando que los organismos que recibieron la dieta con probióticos tuvieron mejor desempeño zootécnico.

Srisapoome y Areechon, (2017), suministraron *B. pumilus*, destacan el Incremento en la actividad fagocítica, así como los niveles de aniones superóxido, por lo que indican una resistencia más efectiva frente a estreptococosis, tanto en condiciones de laboratorio como en cultivos de características comerciales.

El uso de levaduras como probiótico en la acuicultura va en aumento, ya que brindan beneficios nutricionales e inmunológicos a los peces, además de auxiliar en el mantenimiento de la calidad del agua de los cultivos, lo que se traduce en buenos

resultados de producción (Mahdy et al., 2022). A este respecto podemos mencionar el trabajo de Abdel-Tawwab et al. (2020), quienes suministraron *Sacharomyces cerevisiae* en un cultivo de tilapia, reportaron, mejoras en el sistema antioxidante y sistema inmunitario, así como resistencia a la infección por A*spergillus flavus*, de igual manera indicaron que hubo mejora en la talla de los peces.

Por otro lado, Banu et al. (2020), utilizando la misma especie (*S.cerevisiae*) de levadura en bagre de agua dulce (*Mystus cavasius*), indicaron aumento significativo ($p<0.05$) en parámetros de crecimiento (tasa de supervivencia, ganancia de peso, tasa específica de crecimiento y ratio de eficiencia proteica) y una mortalidad del 10% al desafiar a los organismos contra *P. fluorescens*, por lo que mencionan que el uso de la levadura es un buen promotor del crecimiento y una buena alternativa al uso de los antibióticos.

Chen et al. (2019), indicaron que los parámetros inmunológicos del suero mostraron que la actividad de la lisozima (LZM) y el contenido del complemento C3 aumentaron significativamente con la suplementación de *Rhodotorula mucilaginosa* en la dieta 0.5%-1 % ($p<0.05$), en un cultivo convencional de *O.niloticus.*

3.2. Implementación de BFT y su efecto en la respuesta inmune y defensa antioxidante con y sin probióticos

El uso de probióticos en BFT se ha convertido en una estrategia que brinda beneficios adicionales al sistema. En un estudio realizado por Hu et al. (2017), en el cual cultivaron *Penaeus vannamei*, indicaron que la adición de una cepa probiótica del género *Bacillus* favorece el establecimiento de comunidades microbianas benéficas y puede auxiliar en la inhibición de microorganismos patógenos.

Miao et al. (2017), evaluaron la implementación de la BFT adicionada con probióticos en relación con la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades, concluyeron que, al utilizar estas biotecnologías de forma combinada se puede mejorar la inmunidad humoral y hepatopancreática de la especie utilizada *Macrobrachium rosenbergii*. Además, detectaron una proporción relativamente alta de *B. subtilis y Lactococcus* tanto en el agua de cultivo como en el intestino de los organismos en experimentación.

En relación con evaluar el efecto del BFT en el crecimiento, la actividad enzimática del intestino y la respuesta inmune, Long et al. (2015), indican que BFT puede mejorar el crecimiento, las actividades de las enzimas digestivas y la respuesta inmune de tilapia genéticamente mejorada, obteniendo una tasa de supervivencia del 100 %. Además, reportaron un incremento significativo en la actividad de amilasa y lipasa en los peces presentes en el tratamiento BFT.

En otro estudio realizado por Adineh et al. (2019), indicaron que el sistema BFT mejora el crecimiento, la respuesta inmune innata, el estado oxidativo y la resistencia al estrés agudo en la carpa común (*Cyprinus carpio*) bajo alta densidad de población, así mismo reportan concentraciones significativamente menores en los tratamientos con BFT en comparación con los tratamientos de agua clara, indican una densidad de siembra de 12 $kg\ m^{-3}$

3.3. Análisis de expresión genética en acuicultura

El análisis de la expresión génica es una de las técnicas más novedosas en los estudios biológicos en acuicultura, se emplea para identificar la respuesta de genes implicados en el crecimiento, la reproducción, el desarrollo, la inmunidad, y el estrés, a entornos o tratamientos específicos, se realizan principalmente en tejidos como; gónadas, corazón, hígado, cerebro, músculo e intestino, de crustáceos y peces (Chandhini y Rejish, 2019). Algunas de las especies y genes explorados en las que se han llevado a cabo este tipo de análisis se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Especies acuícolas y genes explorados en estudios de expresión génica

Especie	**Genes estudiados**	**Función**	**Tejido/ Etapa de vida**	**Referencia**
Camarón blanco (*Penaeus vannamei)*	*sod, proFO, tg, liz, tg, cr*	Concernientes con el sistema inmune	Hemolinfa	Luna et al. (2013)
Salmon del Atlántico *(Salmo salar*)	*cyp7a1a, dhcr7, elovl2, fadsd5, fadsd6a, cpt1*	Implicados en el metabolismo	Hígado	Hixson et al. (2017)
Esturión Ruso	*amh, ar,*	Involucrados en	Gónadas,	Fajkowska et

(*Acipenser gueldenstaedtii*)	*cyp19, dmrt1, erα, erβ, foxl2, sox9, StAR, vtg*	la diferenciación gonadal	hígado, músculo y cerebro	al. (2019)
Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss)*	*il-1β, il-6a, il-8, il-10a, il-17a/f2a, il-17c1, il-17c2, ifnγ, tnfα*	Relacionados con la respuesta inmune y resistencia a enfermedades	branquias, hígado y bazo	Zuo et al. (2020)
Barramundi (*Lates calcarifer*)	*Igf-1, gh, mstn*	Asociados con la tasa de crecimiento	Hígado	Ezhilmathi et al. (2022)
Cangrejo de barro (*cylla serrata)*	*hsp10, hsp60, hsp70, p53, bax, bcl-2, caspase 3*	Relacionados con la apoptosis y el estrés oxidativo	Hepatopancreas	Yu et al. (2023)

En cuanto a emplear esta herramienta de biología molecular para valorar el efecto de los probióticos en el sistema inmune innato y respuesta antioxidante en tilapia, se encuentra por el ejemplo la investigación de Standed et al. (2013), quienes investigaron el efecto del probiótico *Pediococcus acidilactici* con énfasis específico en la salud intestinal y el nivel de respuesta del sistema inmune en alevines de *O. niloticus*. Reportaron que el tratamiento con probióticos puede potenciar la respuesta inmune en el intestino del hospedero, ya que se observó una regulación positiva de la expresión génica de la citocina proinflamatoria FNTα en los peces alimentados con probióticos y sugieren que el probiótico tiene una acción protectora sobre la mucosa intestinal, estimulando la respuesta inmune innata.

Por su parte Khaled y Rasha (2015), en su estudio reportan que utilizando *B. amyloliquefaciens* como suplemento en la dieta de *O. niloticus* evaluaron la respuesta del sistema inmune frente a una infección experimental, destacando que la suplementación dietética con dicho probiótico, mejora el estado inmune y resistencia, donde observaron aumento significativo en la expresión de los genes interleucina (*il-1*) y factor de necrosis tumoral (*fntα*) en riñones.

Hamdam et al. (2016), observaron una regulación significativa de la expresión de los genes de citocinas, *il-4, il-12* e *ifn-γ*, tras el suministro de *L. plantarum* AH 78 a distintos porcentajes de inclusión, indicaron mejores tasas de crecimiento en los peces alimentados con la dieta que contenía 0.5% de probiótico suplementado

Reda et al. (2018), investigaron los efectos de la suplementación en la dieta (a diferentes porcentajes de inclusión), de nucleótidos de levadura sobre los parámetros hematológicos, la actividad antioxidante, la inmunidad no específica, la expresión de citoquinas intestinales y la resistencia a enfermedades en la tilapia del Nilo, donde concluyeron que la administración de nucleótidos de levadura dietéticos al 0.25% incrementa la actividad antioxidante de SOD, GPx y, la expresión génica de citoquinas relacionadas con el sistema inmune innato (*tgf-β, il-1β, il-10β, tnf-α*) y la resistencia a enfermedades de la tilapia del Nilo.

Al-Deriny et al. (2020), evaluaron los posibles efectos sinérgicos de *Spirulina platensis* y *Bacillus amyloliquefaciens* sobre el crecimiento, la histomorfología y la expresión de genes de respuesta inmunitaria de la tilapia del Nilo, reportando un mayor peso corporal final (54.41 ± 0.1 g) , ganancia de peso (134.46 ± 17.35%) y tasa de crecimiento específica (1.41%) en los peces alimentados con la micro alga y el probiótico con respecto al control; así mismo, indicaron que la expresión de los genes *tnf-α* y *sod*, aumentaron significativamente ($p<0.05$) mencionan la importancia de la inclusión de probióticos en la dieta de tilapia para mejorar la tasa de crecimiento, la histomorfología intestinal y la actividad antioxidante.

En un experimento con tilapia cultivada en condiciones de toxicidad por acetato de plomo, Fadl et al. (2021), evaluaron el efecto de adicionar *Dunaleilla* en la expresión de los genes *g6pd* y *sod* relacionados con el estrés oxidativo, y revelaron que la suplementación de la microalga en la dieta tiene un efecto prometedor sobre la expresión de enzimas antioxidantes en el hígado y podría utilizarse como agente protector contra la intoxicación por acetato de plomo en la tilapia del Nilo.

El cultivo de tilapia en BFT y la adición de probióticos y antioxidantes al mismo, es una práctica cada vez más común, sin embargo, las propiedades probióticas de las levaduras en acuicultura han sido escasamente estudiadas. Por otro lado, el análisis de la expresión génica es una de las técnicas más novedosas en los estudios biológicos en acuicultura, ya que permite un mejor entendimiento de la respuesta biológica ante distintos entornos o

tratamientos. Por lo tanto, es necesario realizar estudios que permitan avalar la efectividad de las practicas recién mencionadas, como una herramienta para mejorar, el crecimiento, la respuesta inmune de las especies y estimular la actividad antioxidante de las mismas frente a patógenos.

4. Pregunta de investigación

¿Cómo modifica la adición de *R. glutinis* la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata (*trf, il1b, fntα, tgfb, hsp70*) y el estrés oxidativo (*sod, cat, gpx*), así como en los índices biológicos y parámetros de calidad del agua de *O. niloticus* cultivados en un sistema biofloc, y cuál es su impacto en la salud y el crecimiento de los peces?

5. Hipótesis

La incorporación de *R. glutinis* en el agua y dieta de *O. niloticus* cultivada en un sistema biofloc estimulará la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata *(trf, il1b, fntα, tgfb, hsp70*), induciendo al mismo mejor respuesta de los genes de estrés oxidativo(*sod, cat, gpx*). Además, se espera que esta levadura mejore los índices biológicos de los peces, como el crecimiento y la supervivencia, y optimice los parámetros de calidad del agua del sistema de cultivo.

6. Objetivo general

Evaluar el impacto de la suplementación con *R. glutinis* en la modulación de genes de respuesta inmune innata (*trf, il1b, fntα, tgfb, hsp70*), estrés oxidativo (*sod, cat, gpx*) y el crecimiento de *O. niloticus* cultivados en sistemas biofloc, así como su efecto en la calidad del agua.

6. 1. Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de *R. glutinis* en los parámetros de calidad del agua en el sistema biofloc
2. Evaluar el impacto de *R. glutinis* en índices biológicos como el crecimiento, supervivencia, factor de condición, conversión alimenticia e índice heptosomático de *O. niloticus*
3. Determinar el efecto de *R. glutinis* en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata y el estrés oxidativo en *O. niloticus*

7. Materiales y métodos

7.1. Material biológico

Juveniles de tilapias del Nilo con un peso promedio de 3.50 ± 0.8 g fueron obtenidos en el Centro Acuícola Zacatepec (Morelos, México) y transportados a las instalaciones del Laboratorio de Análisis Químico de Alimentos Vivos de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. Los peces fueron aclimatados durante cuatro semanas en dos tanques circulares de polietileno de 400 L (volumen de trabajo de 300 L) en agua clara y alimentados con una dieta comercial (32 % de proteína, 5 % de grasa, 5 % de fibra y 5 % de cenizas; Alimentos del Pedregal®, Toluca, Estado de México, México) hasta el inicio del experimento.

7.2. Diseño experimental

Los organismos fueron distribuidos de forma aleatoria en 12 estanques de plástico al 75 % de su capacidad (100 L) a una densidad de 214 peces/m^3 con cuatro réplicas por grupo experimental (15 peces/tanque; peso medio de 7.02 ± 0.04 g), en condiciones de laboratorio con un fotoperiodo de 12h de luz y 12h de oscuridad. Se realizaron tres grupos experimentales: a) cultivo biofloc más la adición *R. glutinis* (BFT+Rg), b) cultivo biofloc sin levadura (BFT) y, c) cultivo convencional de agua clara con recambios (control). El recambio de agua se llevó a cabo cada tres días a una tasa de renovación del 40 %.

Los peces fueron alimentados a una tasa de 5 % de biomasa en tres raciones diarias (9:00 am, 12:00 pm y 3:00 pm) con un alimento comercial de 1.5-2.0 mm (32 % de proteína, 5 % de grasa, 5 % de fibra y 5 % de cenizas; Alimentos del Pedregal®, Toluca, Estado de México, México) y se ajustó cada 16 días, de acuerdo con la biomasa de cada tanque.

7.3. Condiciones de cultivo

En todos los grupos experimentales se utilizaron piedras difusoras de 15 mm conectadas a una bomba de aire para mantener los sólidos en suspensión y la concentración de

oxígeno disuelto en niveles recomendados para el cultivo de tilapia. Se añadió agua dulce una vez por semana (15 L aproximadamente por tanque) para compensar la pérdida por evaporación y se utilizaron calentadores (100 W) para mantener la temperatura a 29 °C.

En los tratamientos biofloc al inicio del experimento, los estanques se llenaron con 30 % de agua de un cultivo convencional de tilapia y 70% de agua clara, para promover una maduración más rápida del sistema. A partir del primer día y hasta el final del ensayo, se agregó diariamente melaza como fuente externa de carbono en una relación 20:1 de C:N para garantizar la adecuada formación de flóculos (Avnimelech, 2015). La relación de C:N se ajustó cada 16 días en función de la relación de alimentación suministrada.

Para el tratamiento BFT+Rg, se utilizó como aditivo una suspensión acuosa de *R. glutinis* (32765 ™ American Type Culture Collection) a una concentración de $1x10^6$ UFC / ml^{-1} de levadura. El inóculo se obtuvo haciendo crecer un cultivo puro de la levadura durante dos días en caldo de extracto de levadura y malta (Yeast Medium) a 27 °C. Se realizaron mediciones espectrofotométricas de la densidad óptica de la suspensión utilizando un, densitómetro bioSan (DEN-1 McFarland) para ajustar la concentración de los microorganismos a 1×10^6 UFC / ml^{-1} (Kushniryk et al., 2014; Wang et al., 2019), el inóculo se añadió dos veces al día, mediante aspersión en el alimento (0.5 ml^{-1}) y el vertido en el agua de cultivo(0.5 ml^{-1}), durante un periodo de 12 semanas.

7.4. Control de la calidad del agua

Los valores de pH, temperatura (T) y oxígeno disuelto (OD) se registraron diariamente a las 9:00 h. utilizando un medidor multiparamétrico Hanna modelo HI 9829 (Rumania). Los niveles de nitrógeno amoniacal total (TAN por sus siglas en ingles), nitrito y nitrato se realizaron cada 10 días por espectrofotometría utilizando un autoanalizador HANNA Aquaculture Photometer modelo HI83203 (USA), siguiendo los procedimientos del fabricante. Los sólidos sedimentables (S.s) se midieron una vez a la semana mediante el volumen de solidos con un cono Imhoff a 30 minutos de acuerdo con lo descrito por Kishawy et al. (2020).

7.5. Biometrías

Se realizaron biometrías de peso inicial y final de forma individual de todos los peces y cada dos semanas se pesaron ocho peces por replica para su seguimiento y ajuste de ración alimenticia, todos los días se llevó a cabo el registro de mortalidad.

A partir de estos datos, se calculó la ganancia de peso (GP), la ganancia de longitud (GL), la tasa de supervivencia (SR %), el factor de Condición de Fulton (FC), factor de conversión alimenticia (FCA) y el índice hepatosomático (IHS) de la siguiente manera:

Ganancia de peso (GP) (g) = Peso final- Peso inicial (1)

Ganancia de longitud (GL) (cm) = Longitud final- longitud inicial (2)

Tasa de supervivencia (%) = Número total de peces cosechados/Número total de peces sembrados x 100 (3)

Factor de condición $FC= (W/L^3) * 100$ (4)

donde W = peso total de los peces (g), L = longitud de los peces (cm) medida desde la punta del hocico hasta el extremo de la aleta caudal media.

FCA = ingesta de alimento/ganancia de peso (5)

IHS (%) = (peso del hígado/peso total del pez) × 100 (6)

Al final del experimento, se capturaron al azar ocho peces por tratamiento y se sacrificaron de acuerdo con Gómez et al. (2010) y Underwood et al. (2013), con una

sobredosis de benzocaína (0.5 g*L-^{1}). El hígado y el intestino distal se extrajeron en frío bajo condiciones asépticas y se tomaron 50 mg de cada tejido que fue almacenado en RNAlater (Sigma Aldrich, USA). Las muestras del tejido se mantuvieron a 4 °C durante 24 horas, y posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento y análisis (Tröβe et al., 2010).

7.6. Extracción de ARN y PCR cuantitativa

El ARN total se extrajo del hígado y del intestino utilizando el PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA) de acuerdo con el manual del fabricante. La cantidad y calidad del ARN se midió mediante electroforesis en gel y espectrofotometría (Eppendorf BioPhotometer, Alemania). Para continuar con el proceso de retrotranscripción sólo se utilizaron muestras de ARN con relaciones OD260nm-OD280nm entre 1.90 y 2.10.

El ARN total (500 ng) se transcribió inversamente en una reacción de 20 µL utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems; USA) en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad, USA). El programa de transcripción inversa consistió en 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C, 5 min a 85 °C y, finalmente, se mantuvo a 4 °C. Las reacciones de qPCR se realizaron con 1 ng de ADNc, cebadores en sentido y antisentido (200 nM cada uno, indicados en la Tabla 5) y SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems).

Tabla 5. Pares de cebadores utilizados para q-PCR. Se indican las secuencias de cebadores, tamaños de amplicones en pares de bases (pb), eficiencias de reacción (€) y coeficientes de determinación de Pearson (R^2).

Gen (símbolo)	**Fwd secuencia (5′-3′)**	**Rev secuencia (5′-3′)**	**Tamaño (bp)**	**E**	**R^2**
gpx	GGAACGACAACCAGGGACTA	TCCCTGGACGGACATACTTC	160	0.92	0.98
sod	GACGTGACAACACAGGTTGC	TACAGCCACCGTAACAGCAG	386	0.95	0.99
cat	GGCCGGGTTTCTAAAAGAAG	GCTGTAAACGTGCAAAGTGG	154	0.91	0.99
hsp70	CAAGATCACCATCACCAACG	TCTTGTCCTCCTCGCTGATT	206	0.94	0.98
tgfb	CGAGCAGCTGTCCAATATGA	AGGTCCATGGCTTAATGTGC	211	1.05	0.94
tfr	GAGCATCGTCCATTCCCTTA	CTCTGGCATTCAATGGAGGT	159	0.95	0.99
tnfa	TCTGGAGTGGAGGAATGGTC	TCTGAGTAGCGCCAGATCCT	204	0.95	0.99
actb	GAGCGTGGCTACTCCTTCAC	GCAGGATTCCATACCAAGGA	234	0.98	0.99
il1b	TTT TGG ATC CTC AGG ACA GG	GTA GCA GAA CAT TGG CAG CA	231	0.96	0.98

La cuantificación relativa de los genes se calculó mediante el método $\Delta\Delta C_T$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando un umbral automatizado y una línea de base móvil para determinar los valores de CT. Las condiciones de la PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización y activación de la polimerasa durante 10 min a 95 °C; 40 ciclos de desnaturalización durante 15 s a 95 °C, recocido y extensión durante 45 s a 60 °C; y una curva de fusión final de 60 °C a 95 °C durante 20 min para comprobar si había artefactos de dímeros de cebadores (Rotor-Gene 6000, Corbett Life Sciences, Australia).

Las condiciones de optimización de la qPCR se realizaron en función de la temperatura de recorrido del cebador (60 °C), la concentración del cebador (200 nM) y la concentración del molde (cinco series de dilución 1:10 por triplicado de 10 ng a 1 pg de ARN de entrada). Los números de acceso del GenBank para los genes estudiados relacionados con la respuesta innata fueron los siguientes: FJ213839.1 para *hsp70*, XM_003459454.2 para *tgfb*, KJ192194.1 para *trf*, AY428948.1 para *tnfa* y XM_003443911.5 para *il1b*, mientras que los relacionados con estrés oxidativo fueron: GQ853451.1 para *gpx*, JF801727.1 para *sod*, JF801726.1 para *cat,*. Se utilizó β-actina (*actb*) como gen constitutivo de referencia interno (GenBank KJ126772.1) Las secuencias de los cebadores y los tamaños de los productos se presentan en la Tabla 5. Los cebadores se diseñaron con el Programa Primer3 versión 0.4.0. Las eficiencias de reacción (E) y los coeficientes de determinación (R2) se calcularon utilizando el Programa del termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences, Australia).

7.7. Análisis de datos

Se comprobó la normalidad y la homogeneidad de la varianza de todos los parámetros analizados mediante la prueba de Shapiro Wilk. Los parámetros de calidad del agua (T, OD, pH, S.s, TAN, nitrito, nitrato), los índices biológicos (GP, SR, FC, FCA, IHS) y la expresión génica se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba *posthoc* de Tukey. En todos los casos, la significación estadística se fijó en $p<0.05$. El análisis estadístico se realizó con el Programa STATISTICA 8.0™ (StatSoft, Inc. USA). Se realizó análisis de correlación de Pearson (r^2) para comprobar el grado de relación las distintas variables (calidad del agua, índices biológicos y expresión de genes) con el programa Sigmaplot versión 12.5 (Systat Software, San Jose, CA, USA), tomando como correlaciones fuertes aquellas entre 0.70 y 1.00. Se elaboraron gráficos de

superficie de respuesta para conocer el efecto combinado de las variables ambientales, índices biológicos y expresión relativa de genes.

8. Resultados

8.1 Parámetros de la calidad del agua

Los parámetros de calidad del agua durante el experimento se resumen en la Tabla 6. Los tanques de control tuvieron valores de OD significativamente más altos (5.71 ± 0.05 mg L^{-1}) que los tratamientos BFT (4.75 ± 0.26) y BFT+Rg (4.73 ± 0.52) ($p<0.05$). El pH del agua fue significativamente más ácido en los tratamientos BFT+Rg (6.97 ± 0.04) y BFT (7.04 ± 0.05), que en el grupo de control (7.55±0.07) ($p<0.05$). Los sólidos sedimentables aumentaron significativamente en BFT+Rg (18.18 ± 0.51 ml/L), en comparación con los tratamientos BFT (16.36 ± 0.33) y control (3.16 ± 0.08) ($p<0.05$).

No se observaron diferencias significativas ($p=0.18$) en el nitrito con un promedio de 85.33 ± 0.11, mientras que para el TAN y el nitrato se mostraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre los grupos experimentales, con el valor más alto en el grupo BFT (0.71 ± 0.21) y el grupo Control (21.5 ± 1.52), respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros de calidad del agua de los grupos experimentales durante 12 semanas de cultivo.

Parámetro	Tratamiento			
	control	**BFT**	**BFT+ Rg**	***p***
T (°C)*	29.45 ± 0.16	29.09 ± 0.78	29.21 ± 0.76	0.22
OD (mg L^{-1})	5.71 ± 0.28^{a}	4.75 ± 0.26^{b}	4.73 ± 0.52^{b}	0.01
pH	7.55 ± 0.35^{a}	7.04 ± 0.24^{b}	6.97 ± 0.20^{b}	0.01
S.s (ml L^{-1})	3.16 ± 0.42^{a}	16.36 ± 1.73^{c}	18.18 ± 2.71^{b}	0.01
TAN (mg L^{-1})	0.52 ± 0.04^{b}	0.71 ± 0.21^{a}	0.60 ± 0.17^{ab}	0.01
Nitrito (mg L^{-1})*	0.89 ± 0.22	0.84 ± 0.06	0.83 ± 0.06	0.18
Nitrato (mg L^{-1})	21.5 ± 1.52^{a}	13.37 ± 1.13^{c}	14.71 ± 1.96^{b}	0.01

Los datos se presentan como media, ± desviación estándar. Superíndices en minúsculas diferentes por fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$). *No existieron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p<0.05$).

8.2 Índices biológicos de *Oreochromis niloticus*

La ganancia de peso, el factor de condición, la tasa de supervivencia, el índice de conversión alimenticia y el índice hepatosomático se muestran en la Tabla 7. Para el tratamiento con la incorporación de la levadura *R. glutinis* (en dieta y agua) a una concentración de $1x10^{6}$ UFC/g (BFT+Rg), tuvo una diferencia significativa ($p<0.05$) en el peso final (46.30 ± 1.75 g), talla final (14.14 ± 088 cm), GP (39.31 ± 1.71 g), así como en el FCA, el cual registró el valor más bajo (1.59 ± 0.10), en contraste con los peces en cultivo BFT (1.88 ± 0.08) y control (2.18 ± 0.13).

Tabla 7. Índices biológicos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivada por 12 semanas en condiciones de a) Con recambio de agua (control), b) En biofloc (BFT) y c) En biofloc más la adición de *Rodhotorula glutinis* (BFT+Rg).

Parámetro	**Tratamiento**			
	control	**BFT**	**BFT+ Rg**	***p***
Peso inicial (g)*	7.06 ± 0.58	6.98 ± 0.45	7.02 ± 0.63	0.97
Peso final (g)	33.50 ± 1.95^{b}	36.01 ± 0.70^{b}	46.30 ± 1.75^{a}	0.04
Talla inicial (cm)*	7.05 ± 0.86	6.98 ± 1.10	7.01 ± 1.08	0.86
Talla final (cm)	11.88 ± 1.57^{c}	12.98 ± 090^{b}	14.14 ± 088^{a}	0.001
GP (g)	26.18 ± 1.91^{b}	29.12 ± 0.70^{b}	39.37 ± 1.7^{a}	0.001
GL (cm)	4.96 ± 1.04^{b}	5.99 ± 0.29^{ab}	7.10 ± 0.41^{a}	0.004
FC	1.99 ± 0.25^{a}	1.61 ± 0.09^{b}	1.67 ± 0.18^{b}	0.00
FCA	2.18 ± 0.13^{a}	1.88 ± 0.08^{ab}	1.59 ± 0.10^{b}	0.012
IHS (%)	1.75 ± 0.17^{b}	2.39 ± 0.10^{a}	1.91 ± 0.12^{a}	0.00
Supervivencia (%)*	81 ± 10.48	95 ± 2.70	92 ± 1.57	0.28

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Superíndices en minúsculas diferentes por fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$). *No existieron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p<0.05$).

La supervivencia de la tilapia del Nilo no se vio modificada por los tratamientos, pero se observó un aumento en los tratamientos BFT y BFT+Rg ($p =0.28$). El IHS (2.39 ± 0.10), reveló un valor significativamente mayor ($p<0.05$) en los peces cultivados en BFT. En cuanto al FC, se observó una diferencia significativa en el tratamiento control (1.99 ± 0.25), respecto a los tratamientos BFT (1.61 ± 0.09) y BFT+Rg (1.67 ± 0.18), siendo más bajo en estos últimos ($p<0.05$).

8.3 Expresión génica

En el hígado, los patrones de expresión de los genes de la inmunidad innata y del estrés oxidativo fueron afectados por la presencia de *R. glutinis* (Figura. 3 y 4). En cuanto a la expresión inmune innata, los genes *tnfa* (0.507 ± 0.13)*, hsp70* (0.512 ± 0.07) y *tgfb* (0.682 ± 0.11) aumentaron significativamente su expresión en BFT+Rg ($p<0.05$). Mientras que *trf*, e *il1b*, mostraron una expresión similar en todos los grupos (Figura. 3). En cuanto a la expresión de los genes del estrés oxidativo en el hígado (Figura. 4), *sod* (1.505 ± 0.27) y *cat* (1.053 ± 0.11), mostraron diferencias significativas en BTF($p<0.05$) en comparación con los otros grupos. En el caso del gen *gpx* a nivel hepático, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura. 4).

La expresión relativa de los genes inmunitarios intestinales y los relacionados con el estrés oxidativo se muestran en las Figuras 5 y 6. La adición de *R. glutinis* afectó significativamente ($p<0.05$) el nivel de expresión en todos los genes estudiados *tnfa,* (0.507 ± 0.13) *hsp70* (329.077 ± 53.00)*, tgfb* (7.85 ± 1.37)*, trf* (4.44 ± 0.76)*,* e *il1b* (8.50 ± 0.33) en comparación con los tratamientos BFT y control (Figura. 5). Del mismo modo, se observó un aumento significativo ($p<0.05$) en la expresión de los genes *cat* (3.78 ± 0.58)*,* y *gpx* (3.11 ± 0.89), en el tratamiento BFT+Rg en comparación con los otros tratamientos (Figura. 6).

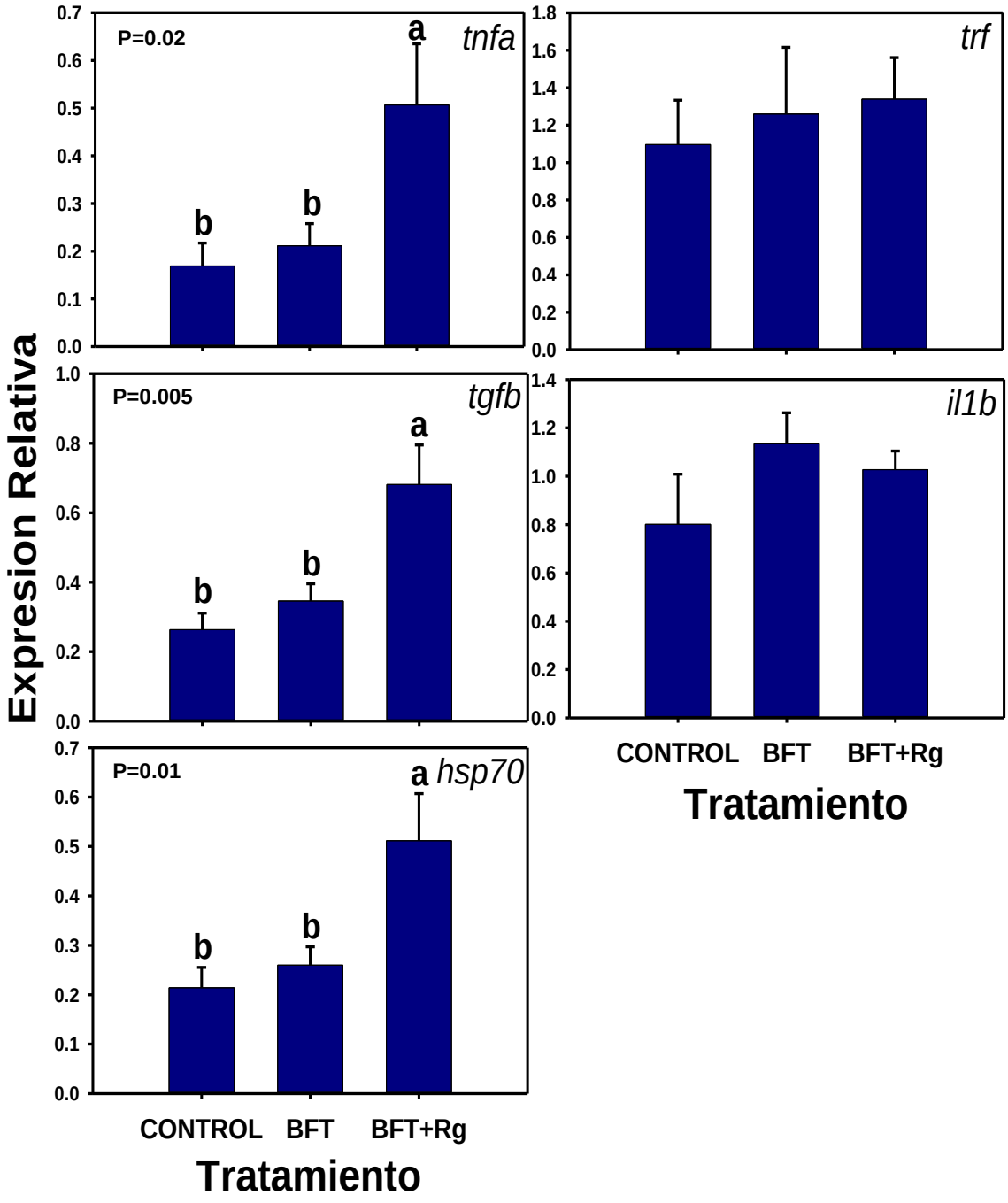

Figura. 3. Expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta inmune innata (*tnfa, trf, tgfb, il1b y hsp70*) en el hígado de *Oreochromis niloticus* bajo diferentes condiciones de cultivo después de 12 semanas. Las barras en los gráficos representan la desviación estándar y las letras diferentes representan valores significativamente diferentes ($p<0.05$) entre grupos experimentales ($n=6$).

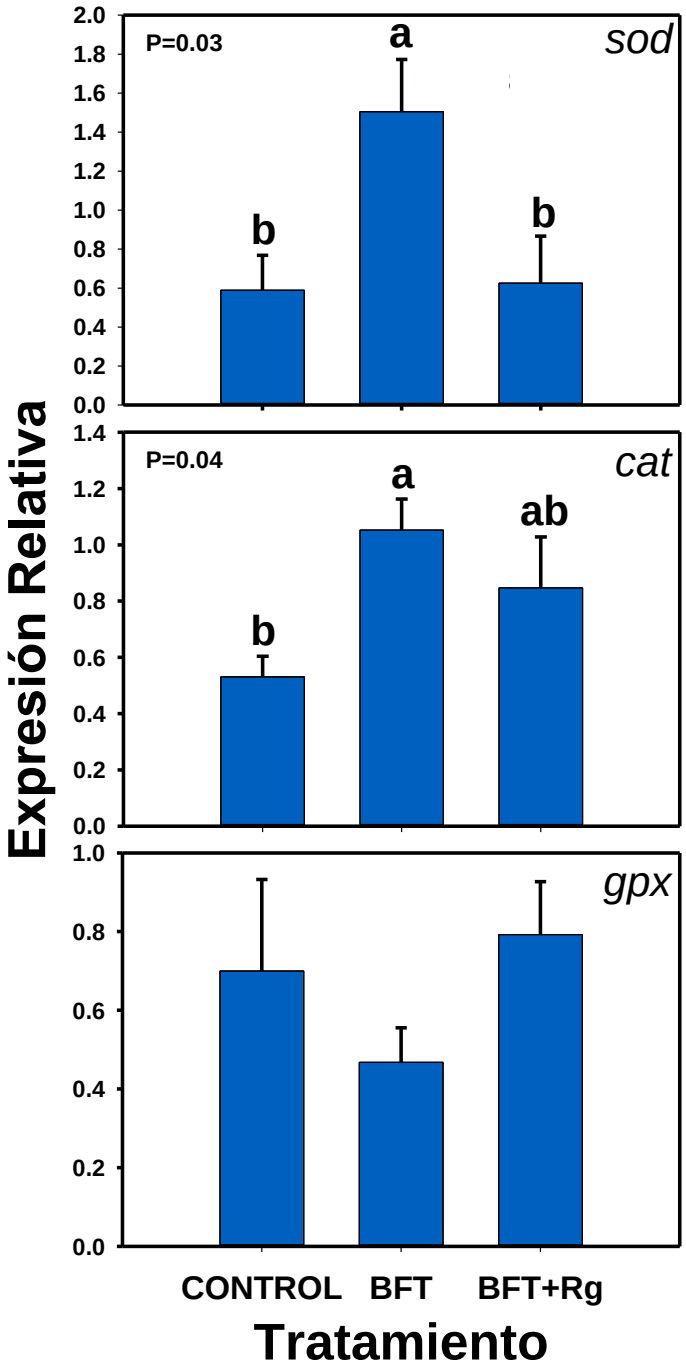

Figura. 4. Expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo (*sod, cat y gpx*) en el hígado de *Oreochromis niloticus* bajo diferentes condiciones de cultivo después de 12 semanas. Las barras en los gráficos representan la desviación estándar y las letras diferentes representan valores significativamente diferentes ($p<0.05$) entre grupos experimentales (n=6).

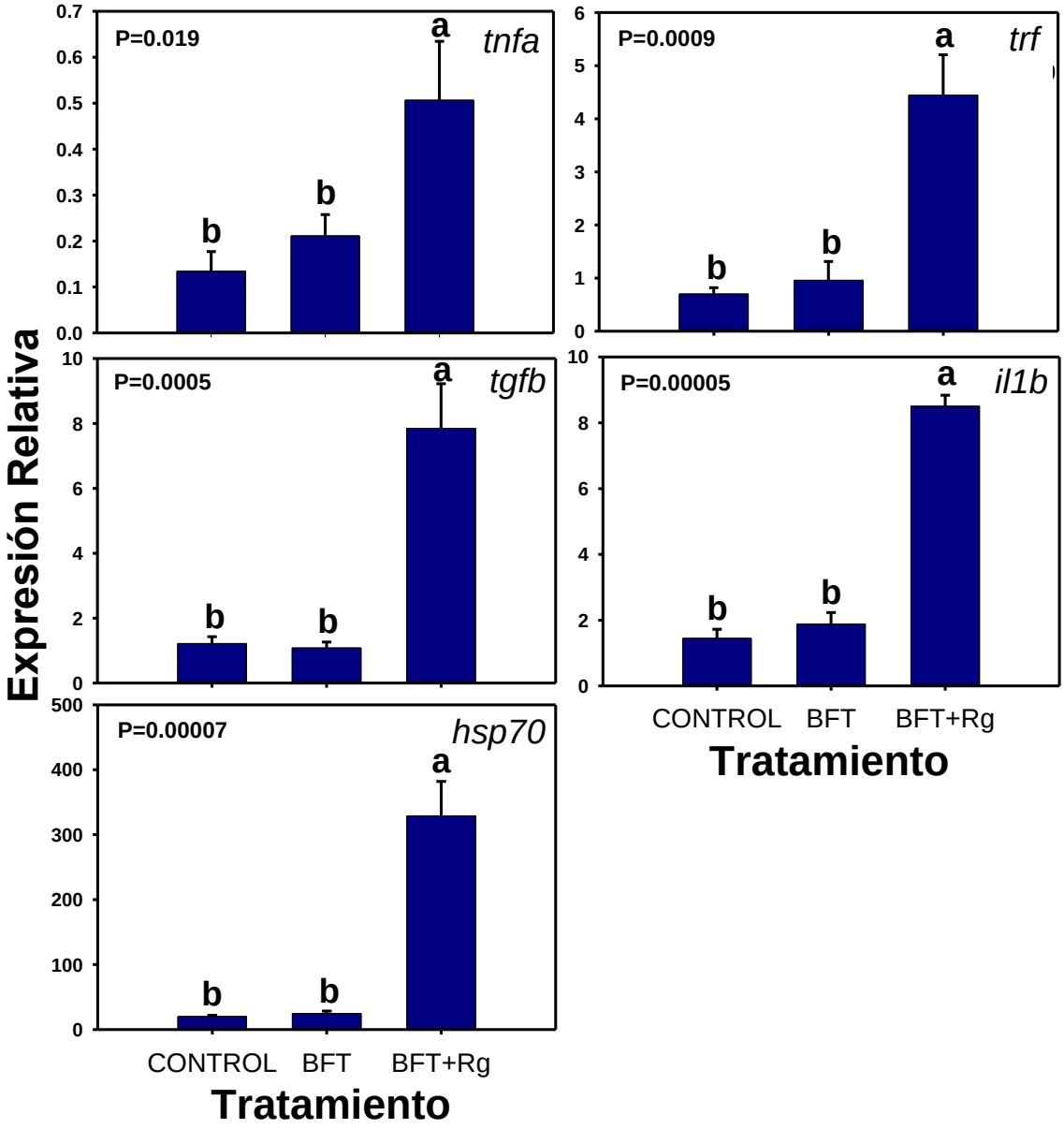

Figura. 5. Expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta inmune innata (*tnfa, trf, tgfb, il1b* y *hsp70*) en el intestino de *Oreochromis niloticus* bajo diferentes condiciones de cultivo después de 12 semanas. Las barras en los gráficos representan la desviación estándar y las letras diferentes representan valores significativamente diferentes ($p<0.05$) entre grupos experimentales tratamientos (n=6).

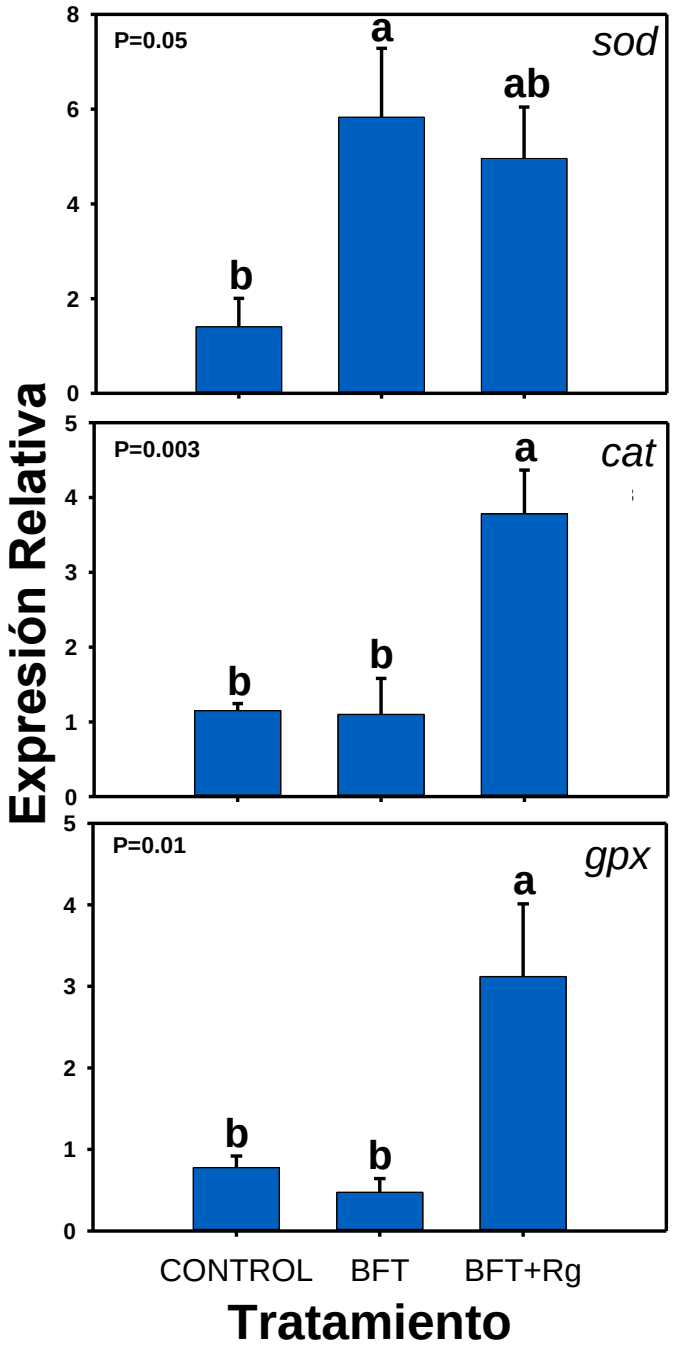

Figura. 6. Expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo (sod*, cat y gpx*) en el intestino de *Oreochromis niloticus* bajo diferentes condiciones de cultivo después de 12 semanas. Las barras en los gráficos representan la desviación estándar y las letras diferentes representan valores significativamente diferentes ($p<0.05$) entre grupos experimentales ($n=6$).

8.4 Análisis de correlación de variables

El análisis de correlación de Pearson entre variables ambientales, índices biológicos y expresión de genes exhibió diversas relaciones significativas ($p<0.05$) tanto en hígado como en intestino. A continuación, se describen aquellas que tuvieron coeficiente de correlación superior al 70%.

En hígado se correlacionaron positiva y significativamente ($p<0.05$) en un 86% el peso y la talla, en 72% el FCA y los nitratos, y en 87% el OD y los nitratos. Mientras que existe una correlación negativa no significativa ($p<0.05$) entre el OD con el TAN y SS del -83 y -93% respectivamente, entre el nitrato con el tan y SS del -91% en los dos casos y del -97% entre nitratos y nitritos

De igual manera el peso final se correlacionó significativamente con los genes *tgfb, hsp70, tnfα* en 71%, para cada caso. La talla final se correlaciono en un 80% con *sod*, 88% con cat, 74% con *tgfb* y *tnfα,*83% con *hsp70* y 88% con *il1b*. El IHS se correlaciono significativamente en 93% con trf ($p<0.05$).

Respecto a los parámetros de calidad del agua y los genes relacionados con estrés oxidativo, el gen *sod* exhibió correlación de 96% con nitrito, 97% con TAN ($r=0.97$) y 97% con S.s, mientras que el gen *cat* se correlacionó en un 86% con nitrito, 96% con TAN y 0.96% con S.s.

Entre genes, *sod* se correlacionó en un 95% con *cat* y en un 88% con *il1b.* cat se correlaciono en un 88% con hsp70 y en 98% con il1b, *tgfb* exhibió correlación con positiva con *hsp70, tnfα e il1b* estas fueron de 97, 100 y 87% respectivamente. Por su parte hsp70 se correlacionó con tnf de 97% y con il1b de 96%. Por último, *tnf* se correlacionó con il1b en un 87%.

En intestino el peso final se correlacionó significativamente ($p<0.05$) con los genes *cat*, *trf, hsp70, il1b* y *tgfb* en 71%, para cada caso. La talla final se correlaciono en un 78% con cat, 88% con *sod*, 72% con *gpx*, 79% con *hsp70,* y 81% con *trf,* 80% con *il1b* y 84% con *tgfb*. El IHS se correlacionó significativamente en 93% con *tnfα* ($p<0.05$).

Respecto a los parámetros de calidad del agua y su correlación con la expresión génica, el gen *sod* exhibió correlación significativa ($p<0.05$). de 87% con TAN y con S.s, mientras que el gen *tgfb* se correlacionó en un 77% con TAN y 0.77% con S.s.

En este órgano las correlaciones entre genes fueron significativamente ($p<0.05$) altas, el gen *cat* se correlacionó en un 94% con *sod*, en un 99% con *gpx* y *tgfb* con *hsp70, trf, e il1b* de 100 %, por su parte el gen *sod* se correlacionó en un en 95% con *il1b* y *hsp70, en* un 89% con *gpx*, 96% con *trf* y 98% *tgfb.* El gen *gpx*, se correlacionó en 99% con *hsp70* e *il1b*, 98% con *trf* y 96% con *tgfb,* mientras que el gen *hsp70* se correlación en un 100% con *il1b* y *trf* y de 99% con *tgfb,* respecto al gen *trf*, este correlacionó significativamente ($p<0.05$) con *il1b* y *tgfb* en un 100%, por último, el gen *il1b* se correlacionó en un 99% con *tgfb*.

8.5 Efecto combinado de los parámetros de calidad del agua, índices biológicos y expresión de genes

En la Figura 7 se muestra la expresión relativa de los genes *tnf, hsp70* y *tgf,* relacionados con la respuesta inmune innata en hígado en función de la talla y el peso, se observa que, al aumentar la talla y peso de los organismos, se presenta una mayor expresión de los genes mencionados, destacándose que dicho aumento en la expresión es mayor con la talla que con el peso. Por otro lado, en la Figura 8, se muestra la respuesta de los genes relacionados con el estrés oxidativo ante compuestos nitrogenados, donde se observa un incremento en la expresión de los genes *sod* y *cat,* así como del gen *il1b* ante el aumento en la concentración de TAN y nitrito.

Al realizar este análisis en el intestino, se observó que, al aumentar peso y talla (variables de respuesta biológica), se incrementó la expresión de los genes (*tgf*, *trf*, *il1b*, y *hsp70*) relacionados con la respuesta inmune (Figura. 9). En cuanto a los parámetros de calidad del agua, los genes *sod* y *tgf*, mostraron aumento en su expresión al aumentar la variables TAN y S,s (Figura. 10).

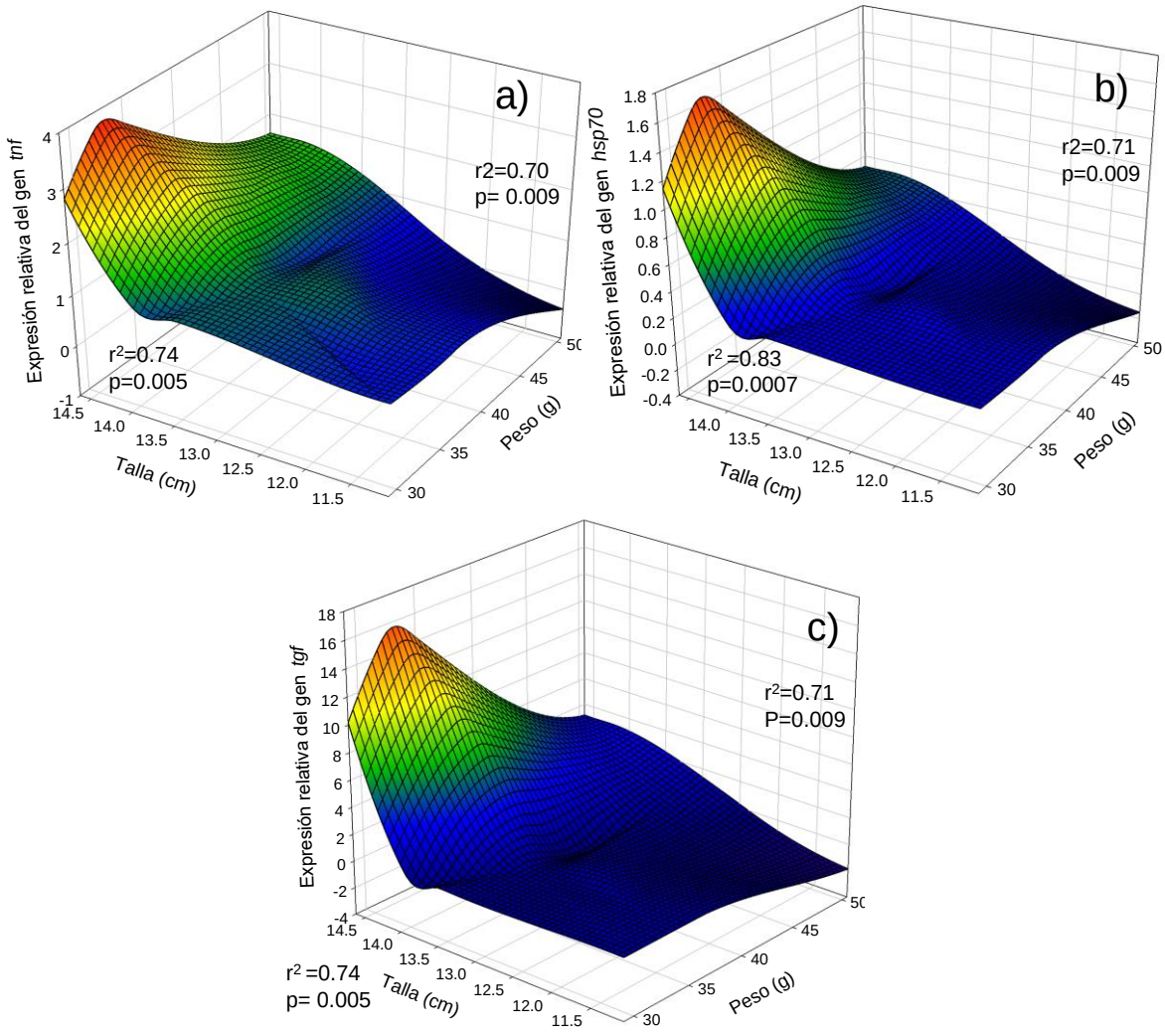

Figura.7. Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune en hígado en función del peso y la talla, de *Oreochromis niloticus* cultivada durante 12 semanas. r^2 =correlación de Pearson, p= significancia de la correlación

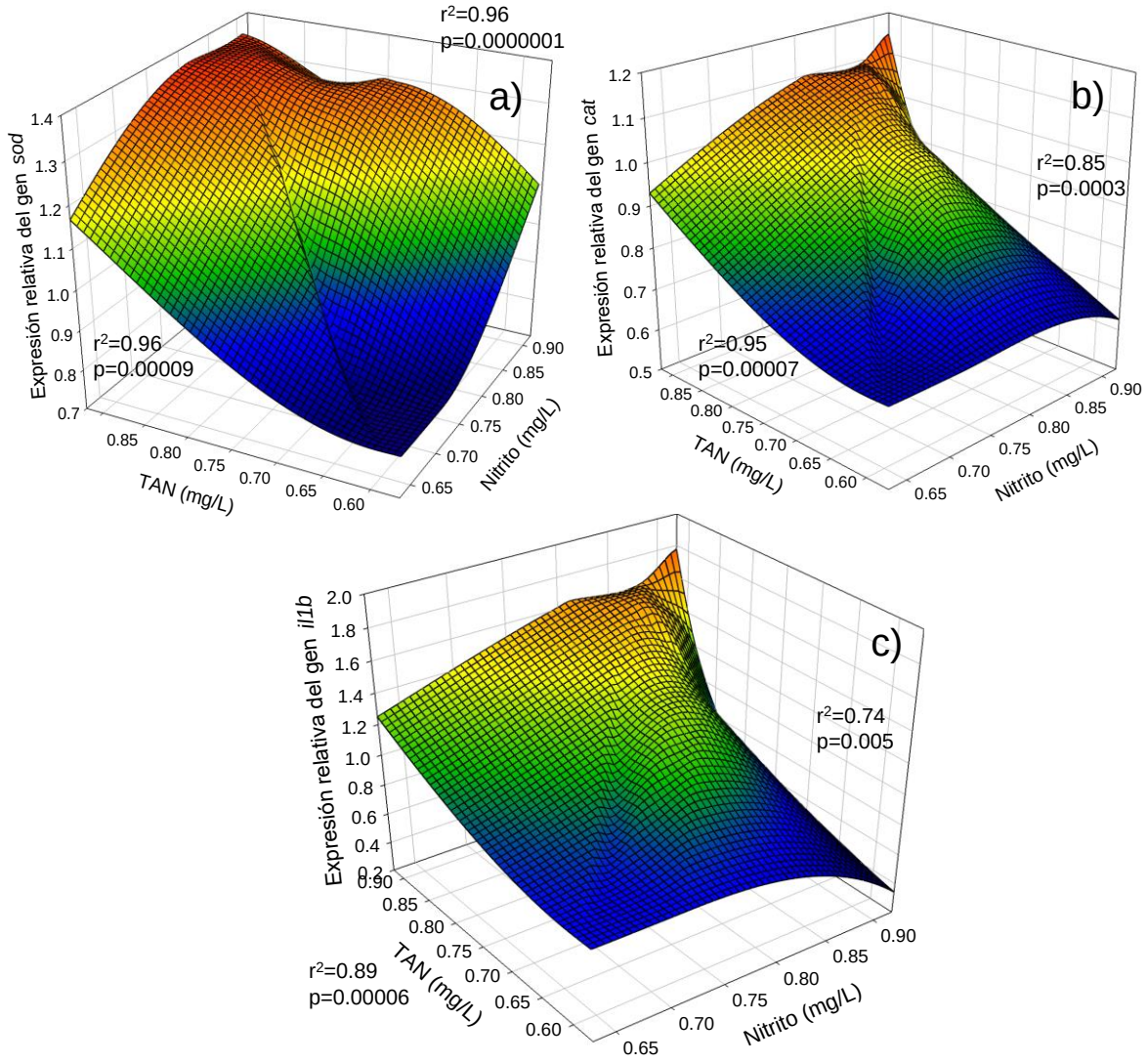

Figura. 8. Expresión relativa de genes relacionados con estrés oxidativo en el hígado en función de TAN y nitritos. r^2 =correlación de Pearson, p= significancia de la correlación

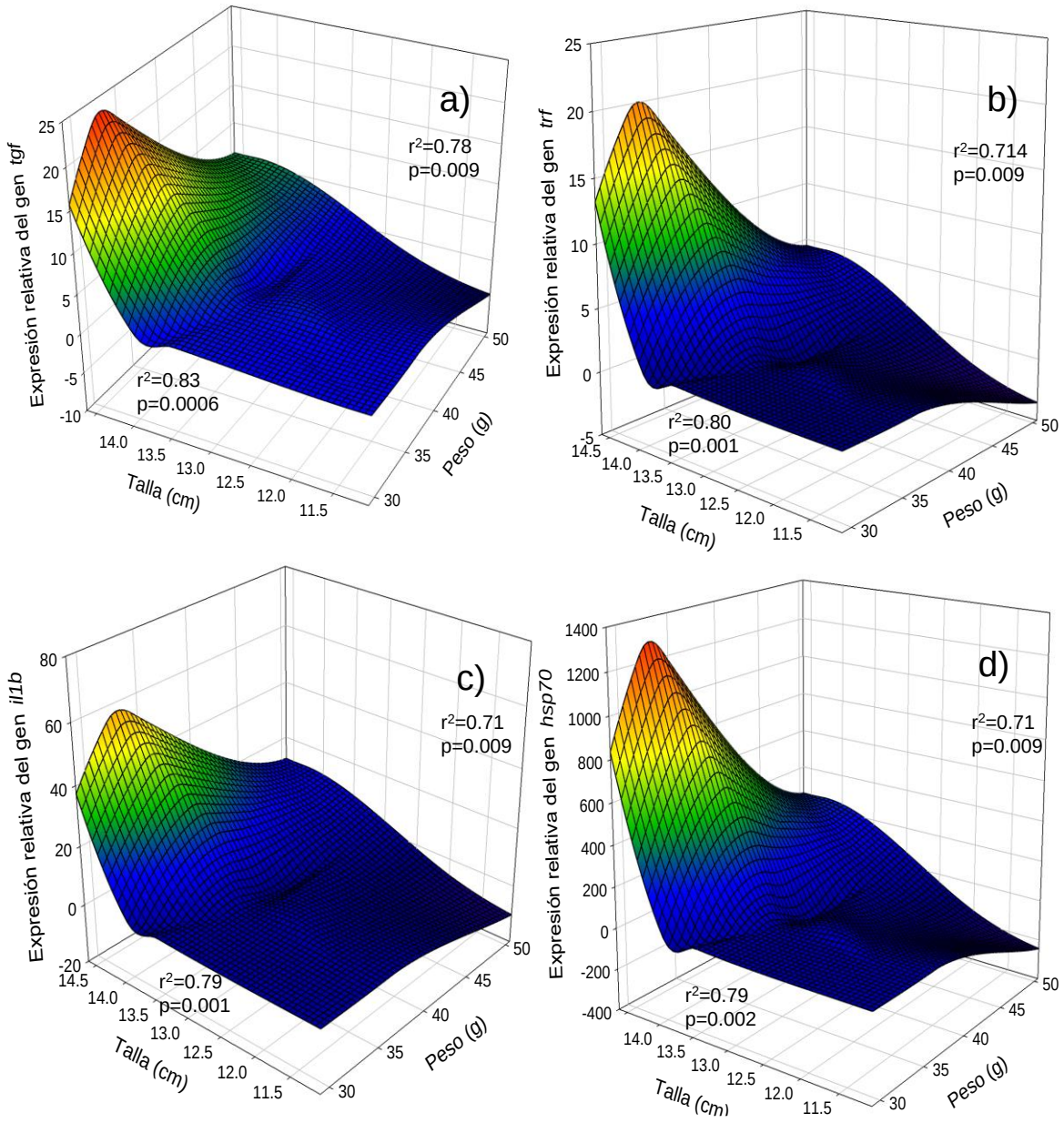

Figura. 9. Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune en intestino en función del peso y la talla, de *Oreochromis niloticus* cultivada durante 12 semanas. r^2 =correlación de Pearson, p=significancia de la correlación

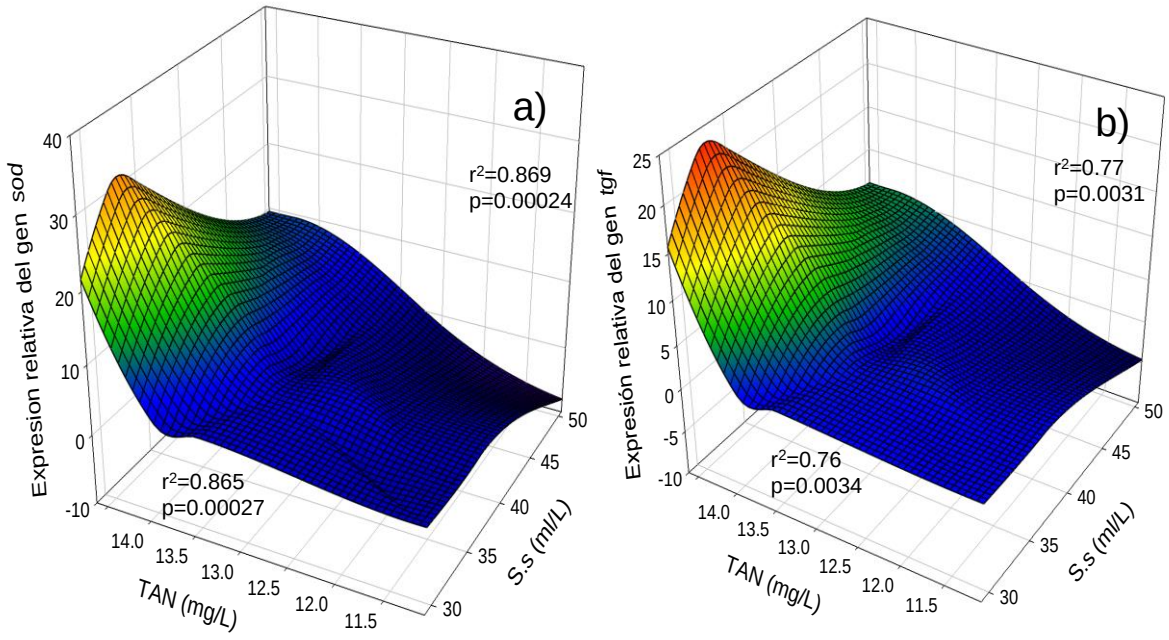

Figura. 10. Expresión relativa en intestino de los genes *sod* y *tgf* en función de TAN y solidos suspendido (parámetros de calidad del agua). r^2 =correlación de Pearson, p=significancia de la correlación

9. Discusión

En la acuicultura la calidad del agua es muy importante para mantener el buen estado de las especies en condiciones de cultivo. La mala calidad del agua puede actuar como un factor limitante en los parámetros de rendimiento, inmunidad e indicadores antioxidantes (Khanjani y Sharifinia, 2020). En el presente estudio, el grupo control presentó valores de OD significativamente más elevados que los otros grupos, lo que se debe al recambio regular de agua o a la ausencia de biomasa bacteriana (Lima et al., 2015). Por el contrario, en los tratamientos con BFT, la disminución del OD puede atribuirse al desarrollo de comunidades microbianas heterótrofas, que lo utilizan para sus actividades metabólicas (Piñeros-Roldan et al., 2020; Gálvez-Cantero et al., 2022). Por ejemplo, Faizullah et al. (2015), indican que el consumo de oxígeno de estas comunidades es alto, llegando a superar el 70 % del total de oxígeno.

Los resultados de esta investigación concuerdan con Putra et al. (2017), quienes en un cultivo de bagre de dientes afilados (*Clarias gariepinus*) en BFT, inocularon la cepa probiótica *Bacillus* sp. (5×10^{10}) y reportaron menores niveles de OD al inocular el

probiótico en tiempos más cortos (cada 5 días), por lo que esta disminución en los niveles de OD se atribuye a la respiración bacteriana.

Los valores de pH del agua estuvieron dentro de los intervalos óptimos para la especie, sin embargo, tendió a ser más ácido en el tratamiento BFT en comparación con el control, mientras que el tratamiento BFT+Rg mostró el valor de pH más bajo y el de mayor volumen de flóculos. Ebeling et al. (2006), Khanjani y Sharifinia (2020), y Kumar et al. (2021), mencionan que los procesos de respiración de los microorganismos de la comunidad BFT influyen en el pH del agua. De la misma manera, la acidificación del agua puede deberse a los procesos de fotosíntesis y nitrificación (Boyd et al., 2011; Hlordzi et al., 2020).

El proceso de asimilación por parte de las bacterias heterótrofas aumenta la concentración de CO_2 en el agua y reduce tanto la alcalinidad como el pH del agua (Boyd et al., 2011; Emerenciano et al., 2017; Kishawy et al., 2020). Así mismo el aporte de manano-oligosacáridos (MOS) en el BFT por parte de *R.glutinis*, podría provocar la diversificación de las bacterias probióticas, que aumentan la proliferación de bacterias lácticas, que asimilan MOS y secretan ácido láctico en el agua, lo que contribuye al pH ácido del agua (Sak-Ubol et al., 2016; Kishawy et al., 2020).

Los valores de pH del presente trabajo son similares a los presentados por Chen et al. (2019), quienes emplearon la levadura *R. mucilaginosa* para promover el crecimiento, respuesta inmune y capacidad antioxidante en juveniles de tilapia, esto puede atribuirse a la presencia de microorganismos en los tanques de cultivo BFT.

Si bien en tilapia la microbiota intestinal dominante no corresponde a bacterias ácido-lácticas, diversos autores han reportado especies bacterianas aisladas de su tracto digestivo como: *L. plantarum, Lactobacillus brevis, L. delbrueckii,* (Jatobá et al., 2008; Gutiérrez, 2016). De igual forma ha sido reportado que diversas especies del género *Bacillus* como *Bacillus coagulans*, *Bacilluscereus stearothermophilus, B. licheniformis*, *Bacillus sp.* Na-2 y *B.subtilis* MUR1, son productoras de ácido láctico (Gao et al., 2012). A pesar del pH más bajo y a la hipotética liberación de ácido láctico, el crecimiento no se vio afectado.

En el presente estudio los compuestos nitrogenados (TAN, NO_2 y NO_3) se mantuvieron en niveles adecuados para el cultivo de tilapia en biofloc de acuerdo con los intervalos mencionados por Emerenciano et al. (2017). Esto concuerda con el estudio de Chen et

al. (2019), quienes utilizando *R. mucilaginosa* hidrolizada, reportaron valores de amonio adecuados para el cultivo de tilapia. De igual manera, Ferreira et al. (2022), utilizaron la levadura *Meyerozyma guilliermondii* en un cultivo de camarón en BFT y reportaron compuestos nitrogenados dentro de los intervalos óptimos, resaltando el potencial biorremediador de la levadura.

Los niveles más altos de NO2 y NO3 se registraron en el grupo sin recambio de agua (control), esto concuerdan con lo reportado por Salazar et al. (2021), quienes en un sistema de cultivo de tilapia con recambio semanal de 50%, reportaron un valor significativamente más alto de nitratos ($p<0.05$). (15.66 $mg.L^{-1}$) respecto al tratamiento sin recambio de agua (11.68 $mg.L^{-1}$), e indicaron que dicha acumulación de nitratos resulto negativa para el crecimiento de los juveniles de *O.niloticus*. La acumulación de compuestos nitrogenados puede estar relacionada con la interrupción del ciclo del nitrógeno provocado por el intercambio de agua, ya que imposibilita el establecimiento de comunidades microbianas que asimilen o transformen dichos compuestos, de acuerdo con Moreno et al. (2020), el establecimiento de microorganismos nitrificantes puede llevar entre 5 y 10 días

Para mantener una buena calidad del agua en el control, se realizaron recambios de agua (40%) cada tres días, mientras que en BFT y BFT+Rg la buena calidad del agua puede atribuirse a los microorganismos presentes en los flóculos, ya que pueden asimilar los contaminantes inorgánicos (amonio y nitrito) de la columna de agua y transformarlos en proteína microbiana, como lo indican Kuhn et al. (2010), Avnimelech (2015), Bossier y Ekasari (2017), Jin et al. (2018), y Kishawy et al.(2020).

La menor concentración de TAN se registró en el tratamiento BFT+Rg, esta reducción puede atribuirse a la adición de la levadura viva *R. glutinis* al agua y al alimento, dado que las levaduras se utilizan con frecuencia en la biorremediación de la calidad del agua para reducir el nitrógeno procedente de la excreción del metabolismo y de los alimentos no consumidos (Jin et al., 2018; Ceseña et al., 2021). Autores como Zhang et al. (2016), y Saenge et al. (2011), mencionan el potencial de *R. glutinis* y *Rhodotorula* spp para eliminar el nitrógeno amoniacal en el agua de cultivo a través de la asimilación de amonio.

Según Chen et al. (2019), los índices de condición corporal son indicadores útiles para evaluar el estado nutricional y fisiológico de los peces. A este respecto, el crecimiento es un índice importante, utilizado habitualmente para evaluar los efectos de los compuestos

probióticos en los ensayos de BFT. Las levaduras se consideran parte de la microbiota normal de los peces, tanto salvajes como de cultivo (Caruffo et al., 2015; Ceseña et al., 2021). Además, se ha demostrado su capacidad de colonización artificial en el intestino del hospedador (Ueno et al., 2011; Navarrete y Tovar, 2014). Por ello, numerosos estudios han evaluado los efectos de las levaduras vivas o de sus subcomponentes y derivados, solos o combinados, sobre el crecimiento de animales acuáticos (Navarrete y Tovar, 2014; Wang et al., 2015; Chen et al., 2019; Ge et al., 2021).

En el presente estudio, la GP en los peces cultivados con BFT+Rg fue significativamente ($p<0.05$), mayor que los del control y BFT sin levadura tras 12 semanas de alimentación. Resultados similares fueron reportados, en los que cepas del género *Rhodotorula* como *R. benthica* y *R. mucilaginosa* mejoraron el crecimiento de los organismos cultivados (Wang et al., 2015; Ge et al., 2021). Chen et al. (2019), difieren al presente trabajo ya que no reportaron diferencias significativas ($p<0.05$) en este parámetro. Sin embargo, los autores mencionan un mayor crecimiento de los organismos que recibieron inclusión de levadura (*R. mucilaginosa*) al 1 % en su dieta.

Las células de *Rhodotorula* son ricas en varios nutrientes como vitaminas E y B, aminoácidos, proteínas, lípidos, carotenoides y MOS (Chen et al., 2019; Schafberg et al., 2020). Por lo que la levadura, además del aporte nutricional a los organismos, puede contribuir con el crecimiento a través de mecanismos relacionados con la modulación de los MOS en la microbiota intestinal. Los MOS participan en el aumento de la integridad de las vellosidades y promovieron la eficiencia de la digestión y la absorción, así como la energía y la proteína de construcción producida a partir del β-glucano degenerado por las glucanasas en la glándula digestiva (Yuji-Sado et al., 2015; Gelibolu et al., 2018; Chen et al.,2019; Yun et al., 2021).

Respecto a la GL en los tratamientos BFT y BFT+Rg, esta fue significativamente mayor ($p<0.05$), respecto al control, dicha ganancia es hipotéticamente atribuible al propio sistema biofloc, ya que proporciona cantidades significativas de nutrientes a los animales cultivados, en relación con esto, Khanjani y Sharifinia (2020), Ahmad et al. (2017), y Daniel y Nageswari, (2017), indican que el aumento del crecimiento de los animales se debe a la ingesta de flóculos microbianos que contienen los nutrientes adecuados que favorecen el crecimiento. Por ejemplo, algunas cepas de bacteriana y de levaduras pueden aportar entre 29-49 % de proteína, 2.5-11.2 % de carbohidratos, 4-6 % de lípidos, así como todos los aminoácidos esenciales (Brown et al., 1996). Microalgas como

Chlorella sp. y *Nannochloropsis oculata* pueden aportar proteína entre 16-35 %, 13-16 % de lípidos, y carbohidratos entre 22 y 54% (Paes et al., 2016). Microorganismos zooplanctónicos como rotíferos pueden contener entre un 54 y 60 % de proteína, entre 3.9 y 13 % de lípidos, los cladóceros alrededor de 50-68 % de proteína y de 1 a 3 % de lípidos, mientras que los copépodos hasta el 70 % de proteína y 2.6 % de lípidos (Kandathil et al., 2020). Las ganancias de peso y talla se ven beneficiados por los hábitos alimenticios de la tilapia, ya que, al ser un pez omnívoro, presenta las características ideales para aprovechar los nutrientes presentes en el sistema de cultivo, dicha especie es reconocida por su capacidad de alimentarse de fitoplancton y zooplancton, detritos, materia orgánica es decir los componentes de los flóculos (Durigon et al., 2024).

El valor nutricional del biofloc, va a variar de acuerdo con factores como la fuente de carbono utilizada, la relación C/N o el tamaño del floculo (Wei et al., 2016). Por otro lado, existen reportes que mencionan que el biofloc presenta deficiencias en el aporte de aminoácidos y ácidos grasos, por ejemplo, Castro et al. (2021), mencionan insuficiencias en dichos nutrientes en cultivos de *P.vannamei*. En especies como cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) cultivado en biofloc, también han sido reportadas deficiencias en cuanto al balance de ácidos grasos, lo que ocasionaría desequilibrio en la composición nutricional de lípidos en los tejidos comestibles del cangrejo de río (Li et al., 2021).

En el presente estudio se observó un mayor IHS en BFT+Rg en comparación con los peces de los grupos control y BFT. A este respecto Rocha et al. (2018), mencionaron un efecto de la dieta sobre el tamaño del hígado, el aumento del IHS es proporcional al aumento de la proteína en la dieta ya que el mayor contenido de proteína absorbida recarga el trabajo del hígado, que responde con un aumento de tamaño, lo que sugiere hipotéticamente un valor más alto de proteína en el tratamiento BFT+Rg.

Con relación al FCA el mejor resultado se obtuvo en el tratamiento BFT+Rg, similar a lo reportado por Nhi et al. (2018), quienes al sustituir harina de pescado por levadura de cerveza (30%) en un cultivo biofloc obtuvieron valores más bajos de FCA (1.39) en este tratamiento respecto a aquellos donde no se adicionó levadura. Avimelech (2015), menciona que la cantidad, calidad y palatabilidad de los flóculos dentro del sistema de cultivo, inducen a los peces a la búsqueda del alimento vivo, lo que tendría un importante efecto sobre el FCA.

En relación con la supervivencia, en el presente estudio no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos. Esto coincide con Nhi et al. (2019), quienes en un cultivo de tilapia en agua clara con recirculación y en sistema biofloc, con inclusión de levadura de cerveza en la dieta (30 %), indicó que dicha tasa no se vio afectada ni por el sistema de cultivo ni por la dieta, así mismo los valores de supervivencia que reporto (95%,98 %) fueron similares a los de la presente tesis (95%, 92%).

Además de los efectos en los índices biológicos, la adición de la levadura modificó la expresión de genes relacionados con la inmunidad innata (*tgfb, trf, tnfα, hsp70 e il1b*) en el hígado e intestino distal de los peces experimentales. Los tejidos seleccionados en el estudio fueron debido al papel inmunitario que juegan en la especie. Por ejemplo, el hígado es uno de los órganos inmunitarios centrales en los peces teleósteos, mientras que el intestino, especialmente el segmento posterior, es inmunológicamente activo y está blindado con varios tipos de células inmunitarias (Wu et al., 2016).

En el intestino se observó un aumento significativo en la expresión de todos genes relacionados con la respuesta inmune innata en los peces cultivados en el tratamiento BFT+Rg, mientras que en el hígado tres de los cinco mostraron diferencia significativa (*tnfa*, *tgfb*, *hsp70*) en comparación con BFT y control. Esto indica la influencia probiótica de la levadura viva *R. glutinis* en la activación de la respuesta inmunitaria. Los resultados del presente trabajo son similares a los reportados por Kishawy et al. (2020), quienes indican un incremento en la expresión de *il-8,*e *ifn-γ* (citocinas proinflamatorias) al emplear un extracto de pared celular de levadura (MOS) como fuente de carbono en un cultivo de tilapia en BFT.

Las funciones de las citocinas relacionadas con los genes evaluados en este estudio son particularmente importantes, debido a que son de los mediadores más estudiados de la respuesta inmune innata en peces (Chen et al., 2014; Wu et al., 2018). El factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), y la interleucina-1β (IL-1β) desempeñan múltiples funciones, como la regulación de la proliferación celular, son reguladores inmunitarios y activan los linfocitos, los macrófagos y las células asesinas naturales, estimulando la liberación de otras citocinas durante la invasión microbiana o cuando hay una lesión tisular (Menaga et al., 2019; Lumsangkul et al., 2021).

Por otra parte, la expresión relativa de los genes que se observó en este estudio, también puede ser influenciada por los β-glucanos, los cuales son componentes estructurales de

las paredes celulares de plantas, bacterias, hongos y levaduras. Particularmente las levaduras han mostrado interesantes propiedades inmunológicas moduladoras, dichos componentes se encuentran dentro de los llamados patrones moleculares asociados a patógenos ($PAMP_S$), los cuales son reconocidos por diferentes receptores celulares de macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, la interacción con dichos receptores induce la producción de diversas citocinas (Navarrete y Tovar, 2014; Ching et al., 2021; Ge et al., 2021).

Si bien los reportes que incluyen la expresión de genes asociados a levaduras o sus componentes son escasos, los parámetros inmunológicos han sido medidos mediante otras técnicas. Por su parte, Chen et al. (2019), indicaron que los parámetros inmunológicos del suero mostraron que la actividad de la lisozima (LZM) y el contenido del complemento C3 aumentaron significativamente con la suplementación de *R. mucilaginosa* en la dieta 0.5 %-1 % ($p<0.05$). Esta estimulación puede atribuirse a los componentes presentes en la levadura, como los β-glucanos, ácidos nucleicos, carotenoides y de MOS (Caruffo et al, 2015; Chen et al., 2019; Kishawy et al., 2020).

En los peces, se ha demostrado que la proteína de choque térmico-70 (HSP-70) desempeña un papel esencial en la defensa inmunitaria contra la infección bacteriana y/o viral, puede estimular la actividad citolítica de las células asesinas naturales (NK) y la producción de NO y quimiocinas por parte de los macrófagos y las células dendríticas (Chen et al., 2014; Wu et al., 2018). En este estudio, en el tratamiento BFT+Rg se observó expresión significativa del gen *hsp70* en el hígado, esto contrasta con lo reportado por Dawood et al. (2020), quienes indican un descenso en la regulación de dicho gen, al suministrar β-glucanos (50 mg/kg) en la dieta de tilapia cultivada a diferentes densidades, así mismo mencionan que la adición de dicho componente de la levadura mejora los marcadores bioquímicos sanguíneos y presentan mejor crecimiento.

El gen *tgfb* se sobre expresó de manera significativa en ambos tejidos estudiados en el tratamiento BFT+Rg a diferencia de los otros grupos. El factor de crecimiento transformante-beta (TGF-β) desempeña papeles activos en la regulación funcional de las células inmunitarias, la proliferación, la diferenciación y la migración celular (Zhan et al., 2015), es decir es de suma importancia por su participación en las vías de señalización de las respuestas inmunitarias (Lin et al., 2014).

Angulo (2015), reportó la expresión del gen *trf* tanto en hígado como en intestino de pargo amarillo sobre expuesto a hierro y retado contra *A. hydrophila*. En contraste, en esta investigación solo se observó expresión relativa del gen en el intestino el cual se considera un importante sitio inmunológico. Respecto a la transferrina, esta se considera un activador de los macrófagos e inhibidor del crecimiento bacteriano al secuestrar el hierro presente en la sangre, limitando su disponibilidad para los patógenos (Vega et al., 2010; Yin et al., 2018).

A nivel de defensa humoral innata, esta glicoproteína forma parte de los factores solubles y juega un papel central en el transporte de hierro entre los sitios de absorción, almacenamiento y utilización de este elemento por parte de los vertebrados (Stafford y Belosevic, 2003)

Si bien el uso de levaduras en la acuicultura va en incremento, los reportes aún son escasos, aun así, se menciona que distintas especies de levaduras, entre ellas *Rhodotorula*, tienen grandes beneficios como promotores inmunológicos (Chen et al., 2019; Nakano y Wiegertjes, 2020; Yun et al., 2021). Según Martin y Król (2017), la transcripción de los genes relacionados con inmunidad y estrés oxidativo se aplica normalmente cuando se investiga el impacto de los aditivos funcionales para dietas en los animales acuáticos.

Respecto al uso de levaduras para estimular la inmunidad innata, en estudios realizados por Yang et al. (2015), y Wang et al. (2015), se menciona que *Rhodotorula sp.* y *R. benthica* colonizan eficazmente el intestino de los pepinos de mar y mejoran la resistencia contra las enfermedades. Por otra parte, *R. mucilaginosa* se ha utilizado como parte de la dieta con una mezcla de microorganismos o sola y se ha demostrado que promueve la inmunidad innata en especies como el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Chen et al., 2019; Wang et al., 2019; Schafberg et al., 2020).

En relación con los genes relacionados con el estrés oxidativo, los resultados mostraron que la suplementación de *R. glutinis* viva, mejora la respuesta de defensa antioxidante en la tilapia, ya que la adición de la levadura al BFT produjo un aumento significativo en la expresión de los genes *cat* y *gpx* en el intestino distal y dichos genes participan activamente en la regulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Carvajal, 2019).

En el tratamiento adicionado con la levadura (BFT+Rg) se observó la sobre expresión del gen *gpx* en el intestino, dicho gen es de importancia ya que codifica para la producción de la enzima GPx, la cual cataliza la oxidación del glutatión (GSH), utilizando H_2O_2 o hidroperóxidos lipídicos (LOOH) como sustratos, produciendo agua y alcoholes, respectivamente (Ighodaro y Akinloye, 2018; Galeana-López et al., 2021).

También se observó un aumento en la expresión de *gpx* en el hígado en el grupo BFT+Rg. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Chen et al. (2020), quienes suministraron levadura hidrolizada (*R. mucilaginosa*) en la dieta de camarón blanco del Pacífico (*P. vannamei*) y mencionan la sobre regulación de los genes, *sod, cat* y *gpx.* Esto podría deberse a la participación de los carotenoides absorbidos en el intestino, en los mecanismos de activación del sistema antioxidante que protegen al organismo de la oxidación de los radicales libres (Hoseinifar et al., 2020).

De igual manera el gen *cat* aumento su expresión significativamente intestino, en el tratamiento con la adición de la levadura (BFT+Rg). Estos resultados son comparables con Andriamialinirina et al. (2020), quienes emplearon levadura hidrolizada (al 1%), y reportaron incremento la actividad enzimática antioxidante de CAT en hígado de tilapia, así mismo mencionan que la catalasa es una enzima muy importante para proteger las células contra el daño oxidativo causado por ROS.

La producción de ROS se eleva por varias reacciones bioquímicas en el organismo como la defensa inmune, el estrés oxidativo o las enfermedades degenerativas. Los genes explorados en este estudio (*cat, sod y gpx*) desempeñan un rol importante en el sistema enzimático de defensa antioxidante de los peces para reducir los efectos negativos de las ROS. Las enzimas SOD, CAT y GPx representan un mecanismo de defensa celular contra la toxicidad de las ROS (Hoseinifar et al., 2020). La catalasa (CAT), cataliza el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para crear agua y controlar los radicales libres de O_2. La superóxido dismutasa (SOD) convierte los radicales superóxido en H_2O_2, protegiendo así contra el daño causado por los radicales libres (Yilmaz, 2019; Lumsangkul et al., 2021). La GPx cataliza la oxidación del glutatión (GSH), utilizando H_2O_2 o hidroperóxidos lipídicos (LOOH) como sustratos, produciendo agua y alcoholes, respectivamente (Galeana-López et al., 2021; Ighodaro y Akinloye, 2018). Esta enzima juega un importante papel en la inhibición de los procesos de peroxidación lipídica y, en consecuencia, en la protección de las células frente al daño oxidativo (Hoseinifar et al., 2020).

Cuando los peces se encuentran en condiciones de estrés, como la temperatura, hipoxia, manipulación, hacinamiento y nutrición deficiente, o mala calidad del agua, el nivel de ROS aumenta y puede provocar la hidroxilación del ADN, la desnaturalización de las proteínas, la peroxidación de los lípidos, la apoptosis y, en última instancia el daño celular (Yilmaz et al., 2019; Hoseinifar et al., 2020; Schafberg, et al., 2020), de ahí la importancia de los genes seleccionados en este estudio, pues a partir de estos se puede evaluar el efecto de la adición de *R.glutinis* sobre la respuesta a el estrés oxidativo.

En la acuicultura se tienen estrategias como la adición de antioxidantes exógenos en la alimentación de los organismos en cultivo, para colaborar con el equilibrio del sistema antioxidante, (mecanismos no enzimáticos) (Hoseinifar et al., 2020). Estos tienen un importante impacto fisiológico en los organismos, ya que fungen como eliminadores de radicales o como promotores de la eliminación de radicales. A este respecto Rathod et al. (2020), mencionan que las vitaminas (el ácido ascórbico o el tocoferol), los compuestos fenólicos (los flavonoides) y los pigmentos como los carotenoides o las clorofilas, son aditivos que deben incluirse en la dieta diaria. La adición de *R. glutinis* proporciona algunos de estos elementos (provitamina A, β-caroteno, toruleno y torularhodina) (Navarrete y Tovar, 2014; kot et al., 2016; Ceseña et al., 2020).

En este estudio se analizaron las interacciones entre grupos de variables distintas a través del análisis de correlación de Pearson para tener un panorama más amplio sobre las variables de mayor peso en el estudio (Jasmin et al., 2022). Las correlaciones más interesantes se dieron entre el grupo de genes relacionados con la respuesta innata con las variables talla y peso, así como entre genes asociados a estrés oxidativo y compuestos TAN, nitritos y S.s.

De igual manera se observó correlación entre los propios genes, lo cual es indicativo de que: los órganos seleccionados para este estudio fueron los adecuados pues ambos son considerados sitios de importancia inmunológica y las interacciones entre grupos de genes son indicativos de que son coparticipes en los procesos de inmunidad innata (producción de citocinas proinflamatorias) y respuesta de defensa antioxidante como se mencionó en apartados anteriores.

Particularmente en el intestino distal, todos los genes relacionados con la respuesta inmune presentaron alta correlación entre sí y con los genes relacionados con estrés oxidativo, al igual que como ocurrió con la expresión de estos genes en este tejido, esto

es indicativo de que la expresión de genes inducida por *R.glutinis*, promovió las distintas funciones intestinales (Absorción y digestión, inmunidad y la defensa intestinal contra el estrés oxidativo).

En el hígado el gen *trf* sólo mostró correlación con IHS, y no con los otros genes o variables, esto es atribuible a que la transferrina no es una citocina y su mecanismo de acción es distinto, siendo el hígado uno de los principales sitios de acción de esta proteína (Reyes, 2008).

Las levaduras son bien conocidas por su papel en la reducción del estrés oxidativo, promotor del crecimiento e inmunoestimulante en peces y crustáceos (Ge et al., 2021), particularmente *R. glutinis* es una buena fuente de antioxidantes carotenoides, además de aportar lípidos, aminoácidos, proteínas, vitaminas E y B, MOS y enzimas (Kot et al., 2016).

Otra característica a favor de las levaduras es que no se ven afectadas por compuestos antimicrobianos, incluso algunas cepas tienen efectos antagónicos contra bacterias patógenas (Rima et al. 2012; Navarrete y Tovar 2014; Caruffo et al., 2015). Además, cumplen varias funciones en el medio acuático, como la degradación de sustratos, la recuperación de nutrientes y la biodegradación compuestos tóxicos (Ferreira et al., 2022). Por lo que *R. glutinis* tiene el potencial de ser considerado como un probiótico (Hoseinifar et al., 2020; Zhang et al., 2016; Wang et al., 2015; Naverrete y Tovar, 2014).

En consecuencia, los organismos bajo la influencia de *R. glutinis* pueden estar en mejores condiciones para responder inmunológicamente y al estrés oxidativo, ya sea debido a factores ambientales o biológicos. Sin embargo, es necesario realizar más estudios en los que se prueben diferentes especies de levaduras ya sea vivas o procesadas, e implementar herramientas de biología molecular y para ampliar el conocimiento de sus mecanismos de acción en las especies acuícolas.

10. Conclusiones

- La adición de *R.glutinis* no contribuyo significativamente al mantenimiento de la calidad del agua, sin embargo, esta se mantuvo dentro de los parámetros óptimos para el cultivo de tilapia en BFT.

- La inclusión de la levadura *R.glutinis* brindó beneficios estadísticamente significativos sobre los parámetros biológicos GP, peso final, e de *O. niloticus.*

- En el tratamiento con la adición de *R.glutinis*, se observó un aumento significativo en la expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune innata (*trf, il-1b, tgfb, fntα, hsp70)* e hígado *(tnfa, tgfb, hsp70)* de *O. niloticus*. La sobre expresión de los genes en dicho tratamiento fue de 379% respecto al grupo control y BFT. Esto indica la influencia probiótica de la levadura *R. glutinis* en la activación de la respuesta inmunitaria.

- La suplementación de *R. glutinis* mejora la respuesta de defensa antioxidante en la tilapia, ya que la adición de la levadura al BFT produjo un aumento significativo en la expresión de los genes *cat* y *gpx* en el intestino distal. Dicho aumento correspondió a una sobre expresión del 333% respecto a los otros dos grupos experimentales.

11. Recomendaciones generales

- Realizar más investigaciones, efectuando modificaciones metodológicas, por ejemplo: escalando dicho estudio, realizando análisis bromatológicos de los flóculos e implementando herramientas bioinformáticas que permitan realizar más análisis e interpretaciones de los datos.
- Generar una línea de investigación que se enfoque en el estudio y aplicación de las levaduras o sus componentes, y sus efectos a nivel inmunitario, nutricional, biorremediador y como antioxidante exógeno.
- Que los resultados de este estudio sean aplicados a sectores productivos, mediante transferencia de tecnología, o a través de eventos de difusión y divulgación.

12. Referencias bibliográficas

Abakari, G., Luo, G., Kombat, O., y Alhassan, H. (2021). Supplemental carbon sources applied in biofloc technology aquaculture systems: types, effects and future research. Reviews in Aquaculture, 13(3), 1193-1222.

Abakari, G., Wu, X., He, X., Fan, L., y Luo, G. (2022). Bacteria in biofloc technology aquaculture systems: Roles and mediating factors. Reviews in Aquaculture, 14(3), 1260-1284.

Adineh, H., Naderi, M., Hamidi, K., y Harsij, M. (2019). Biofloc technology improves growth, innate immune responses, oxidative status, and resistance to acute stress in common carp (*Cyprinus carpio*) under high stocking density. Fish & shellfish immunology, 95, 440-448.

Andriamialinirina, H., Irm, M., Taj, S., Lou, H., Jin, M., y Zhou, Q. (2020). The effects of dietary yeast hydrolysate on growth, hematology, antioxidant enzyme activities and non-specific immunity of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & shellfish immunology, 101, 168-175.

Angulo, M. G. (2015). Caracterización y expresión de transferrina y ferritina del pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) expuestos a hierro ya la infección con A*eromonas hydrophila*.[Tesis de Doctorado]. CIBNOR, México.

Ahmad, I., Babitha, R., Verma, K. y Maqsood, M. (2017). Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. Aquaculture International, 25: 1215-1226. doi: 10.1007/s10499-016-0108-8.

Anunciato, T. y Da Rocha, A. (2012). Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. Journal of Cosmetic Dermatology, 11: 51-54. doi: 10.1111/j.1473-2165.2011.00600.x.

Ariza, G. y Rodríguez, M. (2019). Tecnología Biofloc (BFT), una alternativa sostenible para el desarrollo de la acuicultura: revisión. Ingeniería y Región, 21, 2-11.

Asaduzzaman, M., Wahab M., Verdegem M., Rahman S., Azim, M y Verreth J. (2010). Effects of carbohydrate source for maintaining a high C: N ratio and fish driven re-suspension on pond ecology and production in periphyton-based freshwater prawn culture systems. Aquaculture, 301(1), 37-46.

Al-Deriny, S., Dawood, A., Abou, Z, Wael, F., Paray, A., Van Doan, H., y Mohamed, A. (2020). The synergistic effects of Spirulina platensis and Bacillus amyloliquefaciens on the growth performance, intestinal histomorphology, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Reports, 17, 100390.

Altschul, F., Gish, W., Miller, W., Myres, E y Lipman D. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology, 25, 403-410.

Ávila, J., Ávila, M., Tovar. B., Brizuela, M., y Hernández H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela. 20(2):161-169.

Azim, M y Little, D. (2008). The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, Biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 283, 29-35.

Avnimelech, Y. (2015). Biofloc technology: A practical guidebook. The World Aquaculture Society, Baton Rouge. Lousiana USA.

Balcazar, J., De Blas, I., Ruiz, I., Vendrell, D., Calvo, A, Ḿarquez I, Girones, O, y Muzquiz J. (2007). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). British Journal of Nutrition. 97, 522–527.

Balcazar, J., De Blas, I., Ruiz, I., Cunninghan, D., Vendrell, D y Muzquiz J. (2006). The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol.114, 173-186.

Bañuelos-Vargas, I., Montes de Oca, G.R., Martínez-Montaño, E., Pérez-Jiménez, A., Mendoza-Gamboa, O.A., Estrada-Godínez, J.A. y Hernández, C. (2021). Antioxidant and immune response of juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured at different densities in sea water with biofloc plus probiotics. Aquaculture, 544: 737112. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737112.

Basualdo, L., Jiménez, F., Jiménez, C., Macal, J., Quintero, M., Montañoguilar, D y Gutiérrez, U. (2012). Criterios Técnicos y Económicos para la Producción Sustentable de Tilapia en México. México. Soltar impresiones. 181 p.

Bautista, J., y Velazco, J. (2011). Calidad de agua para el cultivo de Tilapia en tanques de geomembrana. Revista Fuente 3 (8) 10-14.

Becerril-Cortés, D., Monroy-Dosta, M., Emerenciano, M., Castro-Mejía, G., Bermúdez, S., y Correa, G. (2018). Effect on nutritional composition of produced bioflocs with different carbon sources (Molasses, coffee waste and rice bran) in Biofloc system. International Journal of fisheries and aquatic studies, 6(2), 541-547.

Bhosale, P., Motiwale, L., Ingle, A., Gadre, R., y Rao, V. (2002). Protective effect of *Rhodotorula glutinis* NCIM 3353 on the development of hepatic preneoplastic lesions. Current Science, 83: 303-308.

Bhosale, P. (2004). Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, 63: 351-361. doi: 10.1007/s00253-003-1441-1

Biller-Takahashi, J., y Urbinati, E. (2014). Fish immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian Studies. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 8: 1484-1506. doi: 10.1590/0001-3765201420130159.

Birnie, K., Costantini, D., Cooke, S. y Willmore, G. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. Fish and Fisheries, 18(5), 928-942.

Bonilla, M., y Rondón, S. (2011). Biología comparada del sistema de complemento en peces. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, 6(2), 74-90.

Bosisio, F., Rezende, K., y Barbieri, E. (2017). Alterations in the hematological parameters of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to different salinities. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 12: 146-154.

Bossier, P., y Ekasari, J. (2017). Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. Microbial Biotechnology, 10: 1012-1016. doi: 10.1111/1751-7915.12836.

Boyd, E. (2017). General relationship between water quality and aquaculture performance in ponds. In Fish diseases (pp. 147-166). Academic Press.

Boyd, E., Tucker, C., y Viriyatum, R. (2011). Interpretation of pH, acidity, and alkalinity in aquaculture and fisheries. North American Journal of Aquaculture, 73: 403-408. doi: 10.1080/15222055.2011.620861.

Brown, R., Barrett, M., Volkman, K., Nearhos, P., Nell, A., y Allan, L. (1996). Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. Aquaculture, 143(3-4), 341-360.

Brunt, J., Newaj-Fizul, A., y Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiplebacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 30, 573–579 pp.

Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K. y Navarrete, P. (2015). Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. Frontiers in Microbiology, 6: 1-9 1093. doi: 10.3389/fmicb.2015.01093.

Castro, M., De Lara, A., Monroy, D., Maya, G., Castro, M., y Jiménez, P. (2017). Presencia y abundancia de fitoplancton y zooplancton en un sistema de producción de Biofloc utilizando dos aportes de carbono: 1) Melaza y 2) Melaza + pulido de arroz cultivando al pez *Oreochromis niloticus*. Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente. 1 (13): 33-42.

Castro, F., Pinto, C., y Nunes, A. (2021). Nutrient value and contribution of microbial floc to the growth performance of juvenile shrimp, L*itopenaeus vannamei,* fed fatty acid and amino acid-restrained diets under a zero-water exchange intensive system. Aquaculture, 531, 735789.

Casas, I., y Dobrogosz, W. (2000). Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus casei* confers broad spectrum protection against disease in humans and animal. Microbial Ecology of Health Disease 12: 47-285.

Campos, N., Sevilla, M., Velasco, S., Filograsso, C., y Cárdenas, L. (2012). Acuacultura: estado actual y retos de la investigación en México. Revista AquaTIC, 20-25.

Cantor, F. (2007). Manual de producción de tilapia. Secretaría de Desarrollo rural del Estado de Puebla. 60 p.

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

Ceseña, E., Vega-Villasante, F., Aguirre-Guzmán, G., Luna-González, A. y Campa-Córdova, A. (2021). Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: a minireview. International Aquatic Research, 13: 1-16. doi: 10.22034/IAR.2021.1904524.1066

Chandhini, S., y Rejish Kumar, V. (2019). Transcriptomics in aquaculture: current status and applications. Reviews in Aquaculture, 11(4), 1379-1397.Chauhan, A., & Singh, R. 2019. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. Symbiosis, 77(2), 99-113.

Chen, M., Chen, Q., Tian, X., Liu, J., y Niu, J. (2020). Enhanced intestinal health, immune responses and ammonia resistance in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) fed dietary hydrolyzed yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) and Bac*illus licheniformis*. Aquaculture Reports, 17, 100385.

Chen, X., Zhao, W., Xie, W., Xie, J., Zhang, Z., Tian, X., y Niu, J. (2019. Effects of dietary hydrolyzed yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) on growth performance, immune response, antioxidant capacity and histomorphology of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & shellfish immunology, 90, 30-39.

Chen, M., Wang, R., Li, L., Liang, W., Wang, Q., Huang, T. y Luo, H. (2014). Immunological enhancement action of endotoxin-free tilapia heat shock protein 70 against *Streptococcus iniae*. Cellular Immunology, 290: 1-9. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.12.008.

Chowdhury, S., y Saikia, K. (2020). Oxidative stress in fish: a review. Journal of Scientific Research, 12(1), 145-160.

Chu, C., y Lee, D. (2004). Multiscale structures of biological flocs. Chemical Engineering Science, 59(8), 1875-1883.

Ching, J., Shuib, S., Abdul, N., y Mohd, T. (2021). Immunomodulatory activity of β-glucans in fish: Relationship between β-glucan administration parameters and immune response induced. Aquaculture Research, 52: 1824-1845. doi: 10.1111/are.15086.

Choo, X., y Caipang, C. (2015). Biofloc technology (BFT) and its application towards improved production in freshwater tilapia culture. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation, 8(3), 362-366.

Craig, R., Helfrich, L., Kuhn, D., y Schwarz, H. (2017). Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. Virginia Cooperative Extension, 420-256.

Collazos, L., y Arias, C. (2015). Fundamentos de la tecnología biofloc (BFT). Una alternativa para la piscicultura en Colombia: Review. Orinoquia, 19, 77-86.

Conroy, G. (2004). Importantes enfermedades detectadas en tilapias cultivadas en América Central y del Sur. 7p. [En línea] disponible en: http://www.ciabcr.com/charlas/jornadaacuicola/8_Enfermedades_en_Tilapias_Cultivadas_en_las_Americas.pdf.

Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., y Verstraete, W. (2010). The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. J Appl Microbiol, 109, 1643-9.

Crab, R, Defoirdt, T., Bossier, P., y Verstraete, W. (2012). Biofloc techn in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture, 356, 351 - 356.

Crab, R., Kochva, M., Verstraete, W., y Avnimelech, Y. (2009). Bio-flocs technology application in overwintering of tilapia. Aquaculture Engineering 40:105-112.

Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., y Guillaume, J. (2004). Nutrition of *P. vannamei* reared in tanks or in ponds. Aquaculture, 235: 513-551.

Daniel, N., y Nageswari, P. (2017). Exogenous probiotics on biofloc based aquaculture: a review. Current Agriculture Research Journal, 5: 88. doi: 10.12944/CARJ.5.1.11.

Dawood, A., Metwally, S., El-Sharawy, E., Atta, M., Elbialy, I., Abdel-Latif, M., y Paray, A. (2020). The role of β-glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. Aquaculture, 523, 735205.

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., y Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. Aquaculture 277:125-137.

Durigon, E. G., Schneider, T. L. S., Marasca, S., Hermes, L. B., Battisti, E. K., Finamor, I. A., y Lazzari, R. (2024). Biofloc meal for tilapia feeding: growth and oxidative parameters. Aquaculture International, 1-15.

Ebeling, J., Timmons, M., y Bisogn, J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture. 257, 346–358.

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

El-Saadony, T., Alagawany, M., Patra, K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, A. y Abdel-Latif, M. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: an overview. Fish and Shellfish Immunology, 117: 36-52. doi: 10.1016/j.fsi.2021.07.007.

El Sayed, A. (2006). Tilapia culture. CAB Int. Oxfordshire, UK, pp. 33–46.

Emerenciano, M., Gaxiola, G., y Cuzo, G. (2013). Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture, Application and Animal Food Industry. Biomass Now: Cultivation and utilization, 12, 311 -328.

Emerenciano, M., Martínez-Córdova, R., Martínez-Porchas, M., y Miranda-Baeza, A. (2017). Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. Water quality, 5, 92-109.

Estrada, M., Rabell, V., Aguilar, P., y Zarazúa, G. (2023). Tecnologías para optimizar el agua en la acuicultura. Revista Nthe, 41, (1). 19 - 26, ISSN: 2007-9079.

Eyngor, M., Zamostiano, R., Tsofack, K., Berkowitz, A., Bercovier, H., Tinman, S., y Eldar A. (2014). Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. Journal of clinical microbiology. 52(12): 4137 - 4146.

Ezhilmathi, S., Ahilan, B., Uma, A., Felix, N., Cheryl, A., y Somu, R. (2022). Effect of stocking density on growth performance, digestive enzyme activity, body composition and gene expression of Asian seabass reared in recirculating aquaculture system. Aquaculture Research, 53(5), 1963-1972.

Fadl, E., El-Habashi, N., Gad, M., Elkassas, M., Elbialy, I., Abdelhady, H., y Hegazi, M. (2021). Effect of adding *Dunaliella* algae to fish diet on lead acetate toxicity and gene expression in the liver of Nile tilapia. Toxin reviews, 40(4), 1155-1171.

Faizullah, M., Rajagopalsamy, T., Ahilan, B., y Francis, T. (2015). Impact of biofloc technology on the growth of goldfish young ones. Indian Journal of Science and Technology, 8(12), 1. DOI: 10.17485/ijst/2015/v8i13/54060.

Fajer, A., Medina, G., y Morales, S. (2017). Estrategias para la prevención y control de enfermedades parasitarias en tilapia. Act agrícola y pecuaria, 3 (2): 25-31.

Fajkowska, M., Głowacka, D., Adamek-Urbańska, D., Ostaszewska, T., Krajnik, K., y Rzepkowska, M. (2019). Sex-related gene expression profiles in various tissues of juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). Aquaculture 500: 532–539.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue transformation. Thailand. 266 pp.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma 52 pp.

Fernández, A., Ruiz, I., y de Blas, I. (2002). El sistema inmune de los teleósteos (II): Respuesta inmune inespecífica. Revista AquaTIC, nº 17.

Ferreira, L., Martins, M., Ferreira, H., Stambuk, U., Alves, L., Pereira, A., y Mouriño, P. (2022). Yeast *Meyerozyma guilliermondii* inoculation in mature and heterotrophic biofloc systems for *Penaeus vannamei* nursery rearing exhibits bioremediation potential and improvement of shrimp survival. Aquaculture Research, 53(6), 2275-2286.

Furtado, S., Campos, R., Serra, P., Klosterhoff, M., Romano, A., y Wasielesky, W. (2015). Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). Aquaculture international, 23, 315-327.

Galeana, A., Gómez, B., Hernández, C., Leyva, N., Lizárraga, E. y Zenteno, T. (2021). Use of corn husk meal in the development of a functional diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings: effect on growth performance, antioxidant status and intestinal microbiota. Waste and Biomass Valorization, 12: 4355-4365. doi: 10.1007/s12649-020-01314-9.

Gálvez L., Julián-Ricardo, C., y Ramos-Sánchez, B. (2022). El Biofloc en la Acuicultura. Centro Azúcar, 49(2), 136-146.

Gatesoupe, J. (2007). Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. Aquaculture, 267(1-4), 20-30.

Gao, T., Wong, Y., Ng, C., y Ho, K. (2012). L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. Bioresource Technology, 121, 105-110.

Ge, Y., Huang, K., Xie, W., Xu, C., Yao, Q. & Liu, Y. (2021). Effects of *Rhodotorula mucilaginosa* on the immune function and gut microbiota of mice. Frontiers in Fungal Biology, 33: 1-13. doi: 10.3389/ffunb.2021.70569.

Gelibolu, S., Yanar, Y., Genç, M.A. y Genç, E. (2018). Effect of mannan-oligosaccharide supplementation on body growth, fatty acid profile, and organ morphology of gilthead

seabream, *Sparus aurata.* Pakistan Journal Zoology, 50: 229-240. doi: 10.17582/journal.pjz/2018.50.1.229.240.

Gerelmaa, Z., Ch, Z., Batjargal, B., y Ts, R. (2018). Selection of culture media for the production of carotenoids with antioxidant activity by *Rhodotorula glutinis*. Proceedings of the Mongolian Academy of Sciences, 31-38.

Gómez, J., Peña, B., Salgado, H., y Guzmán, M. (2003). Reproductive aspects of *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) at Coatetelco lake, Morelos, Mexico. Revista de biología tropical, 51: 221 -228.

Gutiérrez, R., David, R., Montoya, C., Betancur, G. (2016). Efecto de la inclusión en la dieta de probióticos microencapsulados sobre algunos parámetros zootécnicos en alevinos de tilapia roja (*Oreochromis sp*.). Rev. Salud Anim. Vol. 38 (2) 112-119.

Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, A., y Kuby, J. (2004) Inmunología. McGraw-Hill Interamericana. Mexico.

Hargreaves J. A., (2013). Biofloc production systems for aquaculture. SRAC. 4503, 12.

Hernández, A., Montanez, C., Aguilar, A., Martínez, C., Rodríguez, R. y Aguilar, N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. Food Bioscience, 5: 64-72. doi: 10.1016/j.fbio.2013.11.007.

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

Hixson, M., Parrish, C., Xue, X., Wells, S., Collins, A., Anderson, M., y Rise, L. (2017). Growth performance, tissue composition, and gene expression responses in Atlantic salmon (*Salmo s*alar) fed varying levels of different lipid sources. Aquaculture, 467, 76-88.

Hlordzi, V., Kuebutornye, K., Afriyie, G., Abarike, D., Lu, Y., Chi, S. y Anokyewaa, A. (2020). The use of Bacillus species in maintenance of water quality in aquaculture: a review. Aquaculture Reports, 18: 100503. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100503.

Hoseinifar, H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., y Carnevali, O. (2020). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 1-20.

Hu, X., Cao, Y., Wen, G., Zhang, X., Xu, Y., y Xu, W. (2017). Effect of combined use of *Bacillus* and molasses on microbial communities in shrimp cultural enclosure systems. Aquaculture Research. 48(6):2691-2705.

Ighodaro, M., y Akinloye, A. (2018). First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. Alexandria Journal of Medicine, 54: 287-293. doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.

INAPESCA Instituto Nacional de Pesca. (2018). Acuacultura Tilapia [online]. Disponible en : https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-tilapia.

Ingle, G., Villareal, L., Arredondo, L., Ponce, T., y Barriga, . A. (2003). Evaluación de algunos parámetros de calidad del agua en un sistema cerrado de recirculación para la acuicultura, sometido a diferentes cargas de biomasa de peces. Hidrobiológica, 13(4), 247-253.

Jahangiri, L. y Esteban, Á. (2018). Administration of probiotics in the water in finfish aquaculture systems: a review. Fishes, 3: 33. doi: 10.3390/fishes3030033.

Jasmin, S. A., Ramesh, P., y Tanveer, M. (2022). An intelligent framework for prediction and forecasting of dissolved oxygen level and biofloc amount in a shrimp culture system using machine learning techniques. Expert Systems with Applications, 199, 117160.

Jatobá, A., Vieira, N., Buglione, C., Silva, C., Mouriño, P., Jerônimo, T., y Martins, L. (2008). Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43, 1201-1207.

Jiménez, K., Collazos, F., y Arias, A. (2018). Dynamics and use of nitrogen in Biofloc Technology-BFT. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation, 11(4), 1107-1129.

Jin, M., Xiong, J., Zhou, Q., Yuan, Y., Wang, X. y Sun P. (2018). Dietary yeast hydrolysate and brewer's yeast supplementation could enhance growth performance, innate immunity capacity, and ammonia nitrogen stress resistance ability of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). Fish and Shellfish Immunology, 82: 121-129. doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.020.

Kandathil, D., AkbarAli, I., Schmidt, B. V., John, E. M., Sivanpillai, S., y Thazhakot Vasunambesan, S. (2020). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. Aquaculture Research, 51(1), 1-17.

Khanjani, H., y Sharifinia, M. (2020). Biofloc technology as a promising tool to improve aquaculture production. Reviews in Aquaculture, 12: 1836-1850. doi: 10.1111/raq.12412.

Khaled, M., y Rasha, M. (2015). Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*. Fish & Shellfish Immunology. 44, 496-503.

Khudyi, O., Kushniryk, O., Khuda, L., y Marchenko, M. (2018). Differences in nutritional value and amino acid composition of *Moina macrocopa* (Straus) using yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula glutinis* as fodder substrates. International Letters of Natural Sciences, 68: 27-34. doi: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.68.27.

Kishawy, T., Sewid, H., Nada, S., Kamel, A., El-Mandrawy, A., Abdelhakim, T., & Ibrahim, D. (2020). Mannanoligosaccharides as a carbon source in Biofloc boost dietary plant protein and water quality, growth, immunity, and *Aeromonas hydrophila* resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Animals, 10: 1724. doi: 10.3390/ani10101724.

Kot, M., Błażejak, S., Kurcz, A., Gientka, I., y Kieliszek, M. (2016). *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(14), 6103-6117.

Kuhn, D., Lawrence, L., Boardman, D., Patnaik, S., Marsh, L., y Flick, J. (2010). Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 303: 28-33. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.03.001.

Kumar, V., Roy, S., Behera, BK., y Das, K. (2021). Biofloc microbiome with bioremediation and health benefits. Frontiers in Microbiology, 3499. doi: 10.3389/fmicb.2021.741164

Kushniryk, O., Khudyi, O., Khuda, L., Kolman, R., y Marchenko, M. (2015). Cultivating *Moina macrocopa* Straus in different media using carotenogenic yeast *Rhodotorula.* Fisheries & Aquatic Life, 23: 37-42. doi: 10.1515/aopf-2015-0004.

Li, J., Barreda, R., Zhang, A., Boshra, H., Gelman, E., Lapatra, S., Tort, L., y Sunyer, O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. Nature Immunology, 7(10): 1116-1124.

Li, J., Huang, J., Li, C., Zhang, Y., Wang, Y., Hou, S., y Li, J. (2021). Evaluation of the nutritional quality of edible tissues (muscle and hepatopancreas) of cultivated *Procambarus clarkii* using biofloc technology. Aquaculture reports, 19, 100586.

Lieschke, J., y Trede, S. (2009). Fish immunology. Current Biology, 19: 678-682.

Lima, E., Souza, R., Wambach, X., Silva, L., Correia, D. (2015). Cultivo da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* em sistema de bioflocos com diferentes densidades de estocagem. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 16(4):948-957.

Lin, C., Wang, C., Liu, Y., Chuang, J., Lan, Y. y Chen, S. (2014). The role of TGF-β signaling and apoptosis in innate and adaptive immunity in zebrafish: a systems biology approach. BMC Systems Biology, 8: 1-14. doi: 10.1186/s12918-014-0116-0.

Livak, K., y Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2 ΔΔCT Method. METHODS 25, 402–408.

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

López, P., Jimenez, T., Rodriguez, G., Morales, M., y Vivas, C. (2013). Morfología interna y externa del pez *Oreochromis niloticus*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 12 pp.

López, J., Moreno, A., Miranda, A., Martínez, L., Rivas, M., y Márquez, E. (2014). Proximate composition of bioflocs in culture systems containing hybrid red tilapia fed diets with varying levels of vegetable meal inclusion. North American Journal of Aquaculture.77(1):102-109.

Lumsangkul, C., Tapingkae, W., Sringarm, K., Jaturasitha, S., Le Xuan, C., Wannavijit, S. y Van Doan, H. (2021). Effect of dietary sugarcane bagasse supplementation on growth performance, immune response, and immune and antioxidant-related gene expressions of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under biofloc system. Animals, 11: 2035. doi: 10.3390/ani11072035.

Luna, A., Moreno, T., Campa, I., González, A., Fierro, A., Álvarez, P., y Bueno, A. (2013). Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. Latin american journal of aquatic research, 41(5), 898-907.

Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L., y 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, 422, 1-7.

Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). Fish & Shellfish Immunology, 20(2): 137-151.

Mantilla, L., Vellojín, F., García, P., y Pertúz, B. (2016). Desempeño del crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Oreochromis ssp*. utilizando un probiótico en el alimento. Revista Colombiana de Biotecnología, 18(1), 90-94.

Martin, A., y Król, E. (2017). Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. Developmental & Comparative Immunology, 75: 86-98. doi: 10.1016/j.dci.2017.02.024.

Martínez, M., Morales, E., y Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Rev Fish Biol Fish, 15(1-2), 75-88.

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

Mendoza, G., Castañeda, R., Lango, R., Galaviz, I., Montoya, J., y PoncePalafox, T. (2017). The effect of biofloc technology (BFT) on water quality in white shrimp *Penaeus vannamei* culture: A review. Revista Bio Ciencias. 4(4):1-15.

Metian, M., Troell, M., Christensen, V., Steenbeek, J., y Pouil, S. (2020). Mapping diversity of species in global aquaculture. Reviews in Aquaculture, 12(2), 1090-1100.

Miao, S., Zhu, J., Zhao, C., Sun, L., Zhang, X., y Chen, G. (2017). Effects of C/N ratio control combined with probiotics on the immune response, disease resistance, intestinal microbiota and morphology of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Aquaculture. 476:125-133.

Mohammadi, G., Rafiee, G., Tavabe, R., Abdel-Latif, M., y Dawood, A. (2021). The enrichment of diet with beneficial bacteria (single-or multi-strain) in biofloc system enhanced the water quality, growth performance, immune responses, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 539, 736640.

Mokhtar, M., y Abdelhafez, A. (2021). An overview of the structural and functional aspects of immune cells in teleosts.

Monroy, D., Castro, B., Fernández, F., y Mayorga, L. (2010). Inhibition of *Aeromonas hydrophila* by probiotic strains isolated from the digestive tract of *Pterophyllum scalare.* Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 9, No. 1 (2010) 37-42.

Monroy, D., Castro, B., Castro, M., Castro, J.M., y Lara, A. (2012). Beneficios del uso de probióticos en la flora bacteriana de peces. ContactoS 85, 11–18.

Morales, D. (2003). Biología, cultivo y comercialización de la tilapia. AGT. 205 pp.

Moreno, S., Arámbulo, V., y Herrera, K. (2020). Diseño de un protocolo efectivo para la maduración y manejo de biofiltros para sistemas de recirculación en acuicultura en CENAIM (Bachelor's thesis, ESPOL. FIMCM: Acuicultura).

Moss, B. (2001). Ecology of freshwater. Okford, Blackwell, 557 pp.

Nakano, T., y Wiegertjes, G. (2020). Properties of carotenoids in fish fitness: a review. Marine Drugs, 18 11, 568. doi:10.3390/md18110568.

Naturalista. (2022). Tilapia *Oreochromis-niloticus* Consultado el 21 de enero de 2022. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad https://www.naturalista.mx/taxa/121324-*Oreochromis-niloticus.*

Navarrete, P., y Tovar, D. (2014). Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. In: Hernandez-Vergara, P. y Pérez, C (Eds.). Sustainable aquaculture techniques. IntechOpen, London, pp.136-172.

Newaj, A., Al-Harbi, H. y Austin, B. (2014). Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture, 431: 1-11. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.08.026.

Nhi, Y. (2019). Brewer’s yeast as a protein source in the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) reared in a clear water or biofloc environment. The Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.

Nhi, Y., Da, T., Lundh, T., Lan, T., y Kiessling, A. (2018). Comparative evaluation of Brewer's yeast as a replacement for fishmeal in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*), reared in clear water or biofloc environments. Aquaculture, 495, 654-660.

Ogello, O., Outa, O., Obiero, O., Kyule, N., y Munguti, M. (2021). The prospects of biofloc technology (BFT) for sustainable aquaculture development. Scientific African, 14: e01053. doi: 10.1016/j.sciaf.2021.e01053.

OIE Organización Mundial de Sanidad Animal -. (2017). Tilapia lake virus (TiLV) – A novel *orthomyxolike* virus. Paris: OIE technical disease card.

Oso, J., Ayodele, I., y Fagbuaro, O. (2006). Food and Feeding Habits of *Oreochromis niloticus* (L.) and *Sarotherodon galilaeus* (L.) in a Tropical Reservoir. World Journal of Zoology 1 (2): 118-121 pp.

Olabuenaga, S. (2000). Fish immune system. Gayana (Concepción), 64(2), 205-215.

Pacheco, M., Campa, Á., Aguirre, G., Luna, A., Guzmán, M., y Ascencio, F. (2012). Efecto de Debaryomyces hansenii en la respuesta antioxidante de juveniles de camarón blanco *Penaeus vannamei.* Revista MVZ Córdoba, 17(1), 2820-2826.

Paes, R., Faria, R., Tinoco, A., Castro, J., Barbarino, E., y Lourenço, S. O. (2016). Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella sp*. and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. Latin American Journal of Aquatic Research, 44(2), 275-292.

Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., y Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today, 5: 55-59. doi: 10.1016/j.dit.2013.03.003.

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hiron, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J., y Aoki, T. (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. Dev. Comp. Immunol.,31,372–382.

Pérez, B., Arregui, L., Calvo, P., Salvadó, H., Fernández, N., y Rodríguez, E. (2009) Parámetros biológicos relacionados con la eliminación de nitrógeno en fangos activos. Análisis multivariante en el desarrollo de un índice biológico en estos sistemas. VI Jornadas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo. Sevilla. España. Asociación Científica Grupo Bioindicación de Sevilla., 1 -7.

Pérez, L., Alvarez, Y., Soriano, J., y Pérez, A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. Hidrobiológica, 30(1), 93-105.

Piera, S. (2022). Caracterización funcional del mucus epidérmico en peces de interés productivo: metodología no invasiva de identificación de moléculas biomarcadoras y relación con el estado fisiológico. Revista AquaTIC, (58), 29-32.

Piñeros, J., Gutiérrez, C., Lapa, M., y Emerenciano, M. (2020). Aireación en la tecnología Biofloc (BTF): Principios básicos, aplicaciones y perspectivas. Revista Politécnica, 16(31), 29-40. doi.org/10.33571/rpolitec.v16n31a3.

Praveen, K., Evans, L., y Jaso, L. (2006). Constitutive expression of tumor necrosis factor-alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. Molecular Immunology, 43(3): 279-291.

Poisa-Beiro, L,, Dios, S,, Montes, A., Aranguren, R., Figueras, A., & Novoa, B. (2008). Nodavirus increases the expression of Mx and inflamatory cytokines in fish brain. Molecular Immunology, 45: 218-225.

Pohlenz, C., y Gatlin III, M. (2014). Interrelationships between fish nutrition and health. Aquaculture, 431, 111-117.

Putra, I., Rusliadi, R., Fauzi, M., Tang, M., y Muchlisin, A. (2017). Growth performance and feed utilization of African catfish *Clarias gariepinus* fed a commercial diet and reared in the biofloc system enhanced with probiotic. F1000Research, 6: 1545. doi: 10.12688/f1000research.12438.1.

Rathod, B., Ranveer, C., Benjakul, S., Kim, K., Pagarkar, U., Patange, S. y Ozogul, F. (2021). Recent developments of natural antimicrobials and antioxidants on fish and fishery food products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20: 4182-4210. doi: 10.1111/1541-4337.12787.

Rauta, R., Nayak, B., y Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. Immunology letters, 148(1), 23-33.

Reda, M., Selim, M., Mahmoud, R., y El-Araby, E. (2018). Effect of dietary yeast nucleotide on antioxidant activity, non-specific immunity, intestinal cytokines, and disease resistance in Nile Tilapia. Fish & shellfish immunology, 80, 281-290.

Reyes, C. (2009). Expresión de genes de defensa de la tilapia nilotica *Oreochromis niloticus* alimentada con suplemento de bacterias probióticas. [Tesis Doctoral]. Universidad de Bogotá, 79. pp.

Rima, H., Steve, L. e Ismail, F. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Frontiers in Microbiology, 3: 421. doi: 10.3389/fmicb.2012.00421.

Ringo, E., y Gatesoupe, F. (1998). Acid lactic bactéria in fish: a review. Aquaculture 160, 177–203.

Ringo, E., Harikrishnan, R., Soltani, M., y Ghosh, K. (2022). The effect of gut microbiota and probiotics on metabolism in fish and shrimp. Animals, 12(21), 3016.

Robles. R., Gollas. T., Martínez, M., MartínezC, L. R., Miranda, A., y Vargas, F. (2020). The nitrification process for nitrogen removal in biofloc system aquaculture. Reviews in Aquaculture, 12(4), 2228-2249.

Rocha, C., Caviedes, P., y Perez, A. (2017). Respuestas hematológicas, hepáticas y esplénicas al estrés de tilapias en jaulas y libres en el embalse de Betania, Colombia. Revista AquaTIC, 49: 8-20.

Rodríguez, M., Botero, E., Iregui, A., y Figueroa, J. (2005). Extracción de productos extracelulares de *Aeromonas hydrophila* y sus efectos en tilapia roja (*Oreochromis* spp.) y cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Acta Biológica Colombiana, Vol. 10 No. 2, 75-93 pp.

Rojas, W., Anaya, J., Arisatizabal, B., Cano, L., Gómez, L., y Lopera, D. (2012). Inmunología de Rojas. 16 ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas.

Rombout, H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., y Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. Fish & shellfish immunology, 31(5), 616-626.

Rubio, M. (2010). Inmunología de los peces óseos: Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias, 1(1), 47-57.

Ruiz, I., Fernández, A., y de Blas, I. (2003). El sistema inmune de los teleósteos (IV): Principales factores que afectan a la respuesta inmune. Revista AquaTIC, (19).

Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T., y Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochemistry, 46: 210-218. doi: 10.1016/j.procbio.2010.08.009.

Salas, M., Durazo,M., y Marini, M. (2016). La acuicultura y su impacto en la zona costera del Golfo de California. Biotecnia, 18(3), 37-46.

Salinas, I., Zhang, Y., y Sunyer, O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. Dev. Comp. Immunol. 35, 1346-1365.

Sak-Ubol, S., Namvijitr, P., Pechsrichuang, P., Haltrich, D., Nguyen, T.H., Mathiesen, G., y Yamabhai, M. (2016). Secretory production of a beta-mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system. Microbial Cell Factories, 15: 1-12. doi: 10.1186/s12934-016-0481-z.

Schafberg, M., Loest, K., Müller-Belecke, A., y Rohn, S. (2020). Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on fillets of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 518: 734633. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734633.

Schreck, B., y Tort, L. (2016). The concept of stress in fish. In Fish physiology (Vol. 35, pp. 1-34). Academic Press.

Stafford, L., y Belosevic, M. (2003) Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. Developmental and Comparative Immunology, 27(6)7): 539)554.

Stagaman, K., Burns, A. R., Guillemin, K., y Bohannan, J. (2017). The role of adaptive immunity as an ecological filter on the gut microbiota in zebrafish. The ISME journal, 11(7), 1630-1639.

Standen, B., Rawling, M., Davies, J., Castex, M., Foey, A., Gioacchini, G., Carnevali, O., y Merrifield, D. (2013). Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & Shellfish Immunology. 35, 1097-1104.

Soto, J. (2010). Cultivo de tilapia en estanquería recubierta con plástico impermeabilizante bajo un sistema de recirculación rancho San Luis, Castamay, Campeche. Manifiesto de impacto ambiental. 100 pp.

Tang, L., Huang, K., Xie, J., Yu, D., Sun, L., Huang, Q., y Bi, Y. (2017). 1-Deoxynojirimycin from Bacillus subtilis improves antioxidant and antibacterial activities of juvenile Yoshitomi tilapia. Electronic Journal of Biotechnology, 30, 39-47.

Tepaamorndech, S., Nookaew, I., Higdon, M., Santiyanont, P., Phromson, M., Chantarasakha, K., & Visessanguan, W. (2020). Metagenomics in bioflocs and their effects on gut microbiome and immune responses in Pacific white shrimp. Fish and Shellfish Immunology, 106: 733-741. doi: 10.1016/j.fsi.2020.08.042.

Tröβe, C., Waagbø, R., Breck, O., y Olsvik, P. (2010). Optimisation of gene expression analysis in Atlantic salmon lenses by refining sampling strategy and tissue storage. Fish Physiology and Biochemistry, 36:1217–1225.

Ueno, R., Hamada-Sato, N., Ishida, M., y Urano, N. (2011). Potential of carotenoids in aquatic yeasts as a phylogenetically reliable marker and natural colorant for aquaculture. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1107282595-1107282595.

Uribe, C., Folch, H., Enríquez, R., y Moran, G. J. V. M. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinarni medicina, 56(10), 486.

Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Grandin, T., Greenacre, C., y Yanong, R. (2013). AVMA guidelines for the euthanasia of animals. American Veterinary Medical Association. Schaumburg, IL 60173, 102 pp.

Van Doan, H., Hoseinifar, H., Ringø, E., Ángeles, M., Dadar, M., Dawood, A. y Faggio, C. (2020). Host-associated probiotics: a key factor in sustainable aquaculture. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 28: 16-42. doi: 10.1080/23308249.2019.1643288.

Vega, M., Moreno, M., Lopez, R., y Garcia V. (2010). Inmunología Veterinaria, Edition: 1era. Edición, Chapter: Capítulo 24: Inmunología en peces, Publisher: El Manual Moderno, Editors: Gutiérrez Pabello José Ángel, pp.309-314.

Wang, H., y Leung, Y. (2000). Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. Microbiology, 14 6(Pt 4): 989)998.

Wang, C., Liu, Y., Sun, G., Li, X., y Liu, Z. (2019). Growth, immune response, antioxidant capability, and disease resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed *Bacillus velezensis* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* compound. Aquaculture, 500, 65-74.

Wang, H., Zhao, Q., Liu, F., Wang, H., y Xiao, S. (2015). Effect of potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on the growth performance, digestive enzyme activity and immunity in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish & shellfish immunology, 43(2), 330-336.

Wasave, S., Chavan, R., Naik, D., Wasave, M., Pawase, S., Tibile, M. y Shivalkar, S. 2020. Role of microbes in biofloc systems: a review. J. Exp. Zool. India, 23(1), 903-906.

Wasielesky, W., Atwood H., Stokes, A. y Browdy, L. (2006). Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 258: 396–403.

Wu, J., Liu, G., Sun, Y., Wang, X., Fang, H., Jiang, H., y Dong, J. (2018). The role of regulator FucP in *Edwardsiella tarda* pathogenesis and the inflammatory cytokine response in tilapia. Fish and Shellfish Immunology, 80: 624-630. doi: 10.1016/j.fsi.2018.06.011.

Wu, N., Song, L., Wang, B., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, L., y Zhang, A. (2016). Fish gut-liver immunity during homeostasis or inflammation revealed by integrative transcriptome and proteome studies. Scientific Reports, 6: 1-17. doi: 10.1038/srep36048.

Yang, Z., Sun, J., y Xu, Z. (2015). Beneficial effects of *Rhodotorula sp*. C11 on growth and disease resistance of juvenile Japanese spiky sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Journal of Aquatic Animal Health, 27 2, 71-76. doi.org/10.1080/08997659.2014.993483.

Yilmaz, S. (2019). Effects of dietary blackberry syrup supplement on growth performance, antioxidant, and immunological responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Plesiomonas shigelloides*. Fish and Shellfish Immunology, 84: 1125-1133. doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.012.

Yin, X., Mu, L., Bian, X., Wu, L., Li, B., Liu, J. y Ye, J. (2018). Expression and functional characterization of transferrin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection. Fish and Shellfish Immunology, 74: 530-539. doi: 10.1016/j.fsi.2018.01.023.

Yuji-Sado, R., Raulino-Domanski, F., de Freitas, F., y Baioco-Sales, F. (2015). Growth, immune status, and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). Latin American Journal of Aquatic Research, 43: 944-952. doi: 10.3856/vol43-issue5-fulltext-14.

Yun, L., Wang, W., Li, Y., Xie, M., Chen, T., Hu, C., y Li, D. (2021). Potential application values of a marine red yeast, *Rhodosporidiums sphaerocarpum* YLY01, in aquaculture and tailwater treatment assessed by the removal of ammonia nitrogen, the inhibition to *Vibrio* spp., and nutrient composition. Plos One, 16: 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0246841

Zhan, L., Ma, Y., Wu, Y., Yi, Y., Wang, J.Y., Gao, K., y Li, S. (2015). Cloning and primary immunological study of TGF-β1 and its receptors TβR I/TβR II in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Developmental & Comparative Immunology, 51: 134-140. doi: 10.1016/j.dci.2015.03.008.

Zhang, X., Tan, W., Gong, P., y Guo, Y. (2016). Effect of ammonium-N on malic enzyme and lipid production in *Rhodotorula glutinis* grown on monosodium glutamate wastewater. Biocatalysis and Biotransformation. 34: 18-23. doi: 10.1080/10242422.2016.1201077.

Zhao, P., Huang, J., Wang X, Song L, Yang H, y Zhang G. (2012). The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture. (354): 97-106.

Zou, J., y Secombes, J. (2016). The function of fish cytokines. Biology, 5(2), 23.

Zuo, S., Karami, M., Ødegård, J., Mathiessen, H., Marana, H., Jaafar, M., y Buchmann, K. (2020). Immune gene expression and genome-wide association analysis in rainbow trout with different resistance to *Yersinia ruckeri* infection. Fish & Shellfish Immunology, 106, 441-450.

13. Anexos

13.1 Artículos derivados de la presente tesis

*Becerril-Cortés, D., Hamdan-Partida, A., Mata-Sotres, J. A., Coelho-Emerenciano, M. G., y Monroy-Dosta, M. D. C. (2022). Yeast *Rhodotorula glutinis* as a modulator of innate immune and oxidative stress-related genes in *Oreochromis niloticus* cultured in a Biofloc system. Latin american journal of aquatic research, 50(5), 739-752. DOI: 10.3856/vol50-issue5-fulltext-2937

Becerril et al 2022.pdf

Latin American Journal of Aquatic Research, 50(5): 739-752, 2022
DOI: 10.3856/vol50-issue5-fulltext-2937

Research Article

Yeast *Rhodoturula glutinis* as a modulator of innate immune and oxidative stress-related genes in *Oreochromis niloticus* cultured in a Biofloc system

Daniel Becerril-Cortés[1], Aida Hamdan-Partida[2], José Antonio Mata-Sotres[3] Maurício Gustavo Coelho Emerenciano[4] & María del Carmen Monroy-Dosta[3]
[1]Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Ciudad de México, México
[2]Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, Departamento de Atención a la Salud Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México
[3]Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo, Departamento El Hombre y su Ambiente Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México
[4]CSIRO, Livestock & Aquaculture Program, Bribie Island Research Centre Woorim, QLD, Australia
Corresponding author: María del Carmen Monroy-Dosta (mmonroy@correo.xoc.uam.mx)

ABSTRACT. The effect of live yeast *Rhodoturula glutinis* was evaluated on juvenile *Oreochromis niloticus* cultivated in a Biofloc system. Growth performance and the expression of innate response and relevant oxidative stress genes were evaluated after a 12-week feeding trial. Three experimental treatments were evaluated in a conventional tilapia culture (control), Biofloc culture (BFT), and Biofloc with the addition of the live yeast *R. glutinis* 1×10^6 CFU g^{-1} (BFT+Rg), with four replicates per treatment. In all cases, commercial food was supplied to the organisms (32% protein and 5% lipids). *O. niloticus* juveniles (7.02 ± 0.04 g) were randomly distributed in 12 tanks, each with 15 animals. BFT+Rg treatment showed a significant increase in weight gain compared with the other treatments. Significant improvements were found in Fulton's condition factor, feed conversion rate, and hepatosomatic index under Biofloc conditions, BFT, and BFT+Rg treatments. No significant differences were observed in survival. *R. glutinis* directly influenced gene expression in the liver and intestine. The expression of *tnfa*, *tgfb*, *hsp70*, and *gpx*, genes in the liver significantly increased in the BFT+Rg treatment compared with the other treatments. Similarly, a significant increase was found in intestinal *il1b*, *tnfa*, *tgfb*, *trf*, *hsp70 gpx*, and *cat* expression patterns in the BFT+Rg treatment. Based on the performance and immune response, the present study suggests the use of *R. glutinis* as a strategy to increase the productivity of tilapia in Biofloc culture.

Keywords: *Oreochromis niloticus*; innate immunity; yeast; probiotics; BFT; oxidative stress; gene expression

*Becerril, C. D., Dosta, M. D. C. M., Partida, A. H., Sotres, J. A. M., Martínez, J. B., Huerta, L. R., y Martínez, K. C. (2020). Technologies to assess and increase the innate immune response to infections in tilapia (Oreochromis niloticus). A review. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente, 20(39), 20-20.

Becerril et al 2020.pdf

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Technologies to assess and increase the innate immune response to infections in tilapia (*Oreochromis niloticus*). A review

Daniel Becerril Cortés,[1] María del Carmen Monroy Dosta,[2] Aida Hamdan Partida,[3] José Antonio Mata Sotres,[4] Jaime Bustos Martínez, [3] Leonor Rojas Huerta[5] y Kathia Cienfuegos Martínez.[1]

Abstract. *Within aquaculture, tilapia is one of the most important species, has great physical resistance, is fast growing and adaptable to various growing conditions, in addition to providing meat of excellent nutritional quality, good taste, low spine and affordable price. However, the intensification in its cultivation has implied the appearance of different infectious diseases. This review of the bibliography is aimed at widening the knowledge on the mechanisms associated to the innate immune response of tilapia (Oreochromis niloticus), emphasizing the use of diverse types of immunostimulants for disease control and the techniques used to validate the results of their application, because infectious processes are still the most important limitations in worldwide aquaculture production systems. The review is structured based on three main subjects: innate immunity in bony fish, applicable biotechnology to stimulate innate immunity, and genomic tools related with the assessment of the immune response in fish.*

Keywords: *tilapia, innate immunity, biotechnology, aquaculture, genomic tools.*

Resumen. *Dentro de la acuacultura, la tilapia es una de las especie más importantes, presenta gran resistencia física, es de crecimiento rápido y alta capacidad de adaptación a diversas condiciones de cultivo, además de brindar una carne de excelente calidad nutricional, buen sabor, poca espina y de precio accesible. No obstante, la intensificación en su cultivo ha implicado la aparición de*

[1] Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, e-mail: danielbecerrilc@gmail.com.

[2] Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo.

[3] Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, 5Undergraduate Studies in Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

[4] CONACYT, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, México.

13.2 Presentación en congreso internacional

Participación como ponente en el 1 er Congreso de Acuicultura CONADOA 2022 "Acuicultura Regional: Presente y Futuro" Del 31 de agosto al 3 de septiembre del 2022, República Dominicana con el trabajo titulado **"*Rhodotorula glutinis* como moduladora de los genes relacionados con la inmunidad innata y con el estrés oxidativo en *Oreochromis niloticus* cultivado en un sistema Biofloc"**

La Asociación Dominicana de Acuacultores
(ADOA)
y
El Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc.
(CEDAF)

Otorga el presente

Certificado a

Daniel Becerril Cortés

Por haber participado en el
1er Congreso de Acuicultura CONADOA 2022
"Acuicultura Regional: Presente y Futuro"
Del 31 de agosto al 3 de septiembre de 2022, Uvero Alto, Punta Cana, La Altagracia, República Dominicana

Carlos Mena
Presidente CONADOA 2022

Santiago Tejada
Presidente CEDAF

13.3 Tabla de calidad del agua con valores máximos, mínimos y promedio general.

Parámetro	**Tratamiento control**		
	Promedio	Mínimo	Máximo
T[1] (°C)	29.45 ± 0.86	28.14	31.10
OD[2] (mg/L)	5.71 ± 0.28	5.28	6.32
pH	7.55 ± 0.35	6.84	8.01
S.s[3] (ml/L)	3.16 ± 0.08	2.20	3.20
TAN[4] (mg/L)	0.52 ± 0.04	0.24	0.83
Nitrito (mg/L)	0.89 ± 0.04	0.35	1.29
Nitrato (mg/L)	21.5 ± 0. 29	18.77	24.30

Parámetro	**Tratamiento BFT**		
	Promedio	Mínimo	Máximo
T[1] (°C)	29.09 ± 0.78	27.63	30.52
OD[2] (mg/L)	4.71 ± 0.26	3.88	5.10
pH	7.04 ± 0.24	6.68	7.65
S.s[3] (ml/L)	16.36 ± 1.73	13.01	19.02
TAN[4] (mg/L)	0.71 ± 0.21	0.37	0.98
Nitrito (mg/L)	0.84 ± 0.06	0.73	0.93
Nitrato (mg/L)	13.37± 1.13	11.12	15.01

Parámetro	**Tratamiento BFT+*R.glutinis***		
	Promedio	Mínimo	Máximo
T[1] (°C)	29.21 ± 0.16	27.96	30.89
OD[2] (mg/L)	4.73 ± 0.05	3.60	5.60
pH	6.97 ± 0.07	6.68	7.41
S.s[3] (ml/L)	18.18 ± 0.08	12.00	23.00
TAN[4] (mg/L)	0.60 ± 0.04	0.39	0.92
Nitrito (mg/L)	0.83 ± 0.04	0.63	0.91
Nitrato (mg/L)	14.71 ± 0. 29	12.89	24.20

Los datos se presentan como media, ± error estándar, así como valores máximos y mínimos. 1. Temperatura. 2 Oxígeno disuelto.3 Solidos sedimentables. 4. Nitrógeno total amoniacal.