

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y

AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**“ESTABLECIMIENTO DEL MODELO ANIMAL *DANIO RERIO* (PEZ
CEBRA) EN CONDICIONES DE LABORATORIO”**

TRABAJO DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR

KEVIN FERNANDO VALLES VALVERDE

DIRECTOR

Ing. ANDREA JAZMÍN CHILQUINGA QUISPE MSc.

Ibarra-Ecuador

2024



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
DIRECCIÓN DE BIBLIOTECA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1003517602		
APELLIDOS Y NOMBRES:	VALLES VALVERDE KEVIN FERNANDO		
DIRECCIÓN:	IMBABURA-ANTONIO ANTE		
EMAIL:	kfvallesv@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	-	TELF. MOVIL	0968745454

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	ESTABLECIMIENTO DEL MODELO ANIMAL <i>DANIO RERIO</i> (PEZ CEBRA) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.
AUTOR (ES):	KEVIN FERNANDO VALLES VALVERDE
FECHA: DD/MM/AAAA	25/07/2024
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> GRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. CARLA SANDOVAL GUANO MSc./ Ing. ANDREA JAZMÍN CHILQUINGA MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de esta y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 25 días del mes de julio de 2024

EL AUTOR:



.....

Kevin Fernando Valles Valverde

C.I.:1003517602

ACEPTACIÓN

**CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN
CURRICULAR**

Ibarra, 25 de julio de 2024.

Ing. Andrea Chilingua MSc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

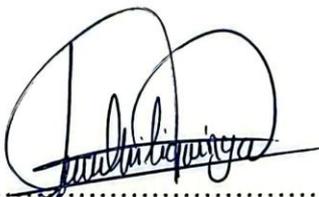

①

Ing. Andrea Chilingua MSc.

C.C.: 1720064193.....

**APROBACIÓN DEL COMITÉ
CALIFICADOR**

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular “ESTABLECIMIENTO DEL MODELO ANIMAL *DANIO RERIO* (PEZ CEBRA) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.” Elaborado por Kevin Fernando Valles Valverde, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(f).....

Ing. Andrea Chilibingua MSc.

C.C.: 1720064193.....

(f).....

Ing. Carla Sandoval MSc.

C.C.: 1718017294.....

DEDICATORIA

El trabajo de titulación está dedicado a mis padres Fernando Valles, Cecilia Valverde y mi hermana Liseth Valles. Quienes fueron los principales pilares durante el transcurso de mi carrera universitaria. Apoyándome e impulsándome para mejorar no solo académica sino personalmente forjando valores y hábitos que me ayudaron a concluir esta meta importante en mi vida.



AGRADECIMIENTOS

Expreso mi mayor agradecimiento a mis padres y familiares por haberme apoyado en cada momento de mi vida

A mi madre Cecilia Valverde por haberme aconsejado y brindado el cariño incondicional día tras día.

A mi padre Fernando Valles por haberme enseñado e inculcado valores y siempre brindarme apoyo en cada faceta de mi vida.

Agradezco a mis guías de tesis mi tutora MSc. Andrea Chiliquina y asesora Msc. Carla Sandoval por haberme orientado, con paciencia durante el proceso de titulación siendo el principal pilar del estudio.

Agradezco al biometrista Msc. Gabriel Chimbo por ser un guía durante el periodo de investigación y formación académica.

Agradezco a la Ingeniera María Cevallos Técnica del laboratorio por ser paciente en el proceso de aprendizaje y desenvolvimiento en el laboratorio.

A los chicos que ayudaron a ser posible el establecimiento del área del pez cebrá, por su compromiso con él estudió, además del apoyo académico y emocional: Vanessa Otavalo, Génesis Arciniega, Ricardo Benalcázar y Aaron Sánchez.

A mis amigos Ariel Valverde, Josef Armas, Rosario Quiroz, Anderson Domínguez, Danilo Chiza y Adrián Guitarra por su colaboración, consejos y ánimo.

Agradezco a Mireya Túquerres por siempre estar y haberme apoyado en mi formación Universitaria ✨.

RESUMEN EJECUTIVO

En los últimos años en Ecuador las instituciones de educación superior han implementado modelos animales como murinos y peces. *Danio rerio* es un modelo de fácil desarrollo y manejo a nivel de laboratorio, altamente estudiado fenotípica y genómicamente. Atractivo por su genoma con un 71% de homología al del ser humano, además, su embriogénesis transparente lo hace idóneo para investigaciones de desarrollo de órganos y pruebas de toxicidad. La presente investigación buscó establecer al pez cebra como modelo animal de experimentación en la Universidad Técnica del Norte. Se utilizaron especímenes variedad salvaje para la introducción, estableciendo configuraciones de peceras que mantienen los parámetros en rangos establecidos por la OECD y ZIRC, organismos internacionales de regulación del pez cebra. Asimismo, se desarrollaron protocolos de reproducción con un éxito de eclosión del 86.6% a través de sistemas de maternidad tipo Bach. Finalmente se estableció la alternativa alimenticia más adecuada a partir de las variables morfométricas peso-longitud y coeficientes de condición, concluyendo un peso a través de la ingesta de alimento vivo de artemia salina al cabo de 124 días de 226.0 ± 10.1 mg y una longitud media de 25.9 ± 1.3 mm. Se identificaron 7 tipos de bacterias gram negativas oportunistas (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella shigella*) en el microbiota estructural del pez cebra en los diferentes estadios alevín, juvenil y adulto, producto de las dietas y manejo dentro del área de mantenimiento de la especie. En base a esta información se elaboró un manual de manejo y mantenimiento de *D. rerio* bajo condiciones de laboratorio.

Palabras clave: *Danio rerio*, alimentación, peso, longitud, parámetros, microbiota.

ABSTRACT

In recent years in Ecuador, higher education institutions have implemented animal models such as murines and fish. *Danio rerio* is a model that is easy to develop and manage at the laboratory level, well studied phenotypically and genomically. Attractive for its genome with 71% homology to that of the human being, in addition, its transparent embryogenesis makes it ideal for organ development research and toxicity tests. The present research sought to establish zebrafish as an experimental animal model at the Universidad Técnica del Norte. For the introduction, specimens of wild varieties were used, establishing fish tank configurations that maintain the parameters in ranges established by the OECD and ZIRC, international regulatory bodies for zebrafish. Likewise, reproduction protocols were developed with a hatching success of 86.6% using Bach-type maternity systems. Finally, the most appropriate food alternative was developed based on the morphometric variables weight-length and condition coefficients, concluding a weight through the intake of live brine shrimp food at 124 days of 226.0 ± 10.1 mg and a length average. 25.9 ± 1.3 mm. 7 types of opportunistic gram-negative bacteria (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella shigella*) were identified in the structural microbiota of zebrafish in the different stages of fry, juvenile and adult, as well because of diets and management within the species' maintenance area. Based on this information, a manual for the management and maintenance of *D. rerio* under laboratory conditions was prepared.

Keywords: *Danio rerio*, feeding, weight, length, parameters, microbiota.

LISTA DE SIGLAS

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

ZIRC: Zebrafish International Resource Center

3R: Reemplazo, reducción y refinamiento

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ADN: Ácido desoxirribonucleico que contiene la información hereditaria

E2: Solución embrionaria 2

FF: Filtros prefabricados

FM: Filtros modificados

MA: Malla

CA: Canicas

hdf: Horas post fecundación

ESP: Espirulina

TRT: Tetracolor

AS: Artemia salina

K: Factor de Condición de Fulton

R²: Coeficiente de correlación

b: Coeficiente de crecimiento

EMB: Eosina y azul de metileno

APS: Aeromona pseudo selectivo

CT: Cetrimida

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	6
AGRADECIMIENTOS.....	7
RESUMEN EJECUTIVO	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE SIGLAS.....	10
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	14
ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
ÍNDICE DE ANEXOS.....	16
CAPÍTULO I.....	17
1 INTRODUCCIÓN	17
1.1 Problema de investigación	17
1.2 Justificación	18
1.3 Objetivos.....	19
1.3.1 Objetivo General.....	19
1.3.2 Objetivos Específicos	19
1.4 Hipótesis o preguntas de investigación.....	19
CAPÍTULO II	20
2 MARCO TEÓRICO	20
2.1 Modelo animal	20
2.1.1 Generalidades	20
2.1.2 Las 3 R.....	20
2.1.3 Modelos utilizados.....	21
2.1.4 El pez cebra como modelo animal.....	21
2.2 Pez cebra.....	22
2.2.1 Taxonomía	22

2.2.2	Distribución y habitad.....	23
2.2.3	Condiciones de laboratorio	24
2.2.4	Alimentación.....	24
2.3	<i>Danio rerio</i> en la ciencia.....	25
CAPÍTULO III.....		27
3	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1	Descripción del área de estudio	27
3.1.1	Distribución del lugar	27
3.2	Configuración del sistema de peceras.....	28
3.1.2	Sistema de aireación	28
3.1.3	Filtros y termostato	29
3.3	Desinfección del sistema de peceras.....	29
3.4	Procesamiento del agua	29
3.5	Obtención de especímenes.....	31
3.5.1	Aclimatación.....	31
3.5.2	Disposición de peces.....	32
3.5.3	Reproducción	34
3.5.3.1	Desinfección de embriones.....	34
3.6	Alimentación.....	35
3.7	Fisiología	35
3.8	Microbiología	36
3.1.4	Recolección de la muestra	36
3.1.5	Procesamiento de la muestra	37
3.1.6	Aislamiento de microorganismos	37
3.9	Elaboración de manual de manejo y mantenimiento del pez cebra en condiciones de laboratorio	38
3.10	Análisis estadístico	38

CAPÍTULO IV	39
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1 Descripción general del sistema de peceras.....	39
4.2 Química del agua	40
4.3 Reproducción	42
4.3.1 Validez del método de reproducción.....	42
4.3.2 Evaluación de la temperatura en la reproducción	44
4.4 Alimentación.....	46
4.4.1 Peso y longitud	46
4.4.2 Relación peso longitud	48
4.5 Identificación de especies microbianas	49
4.5.1 Alevín	50
4.5.2 Juvenil y adulto.....	51
4.6 Manual de manejo y mantenimiento del pez cebra.....	54
CAPÍTULO V.....	55
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
5.1 Conclusiones.....	55
5.2 Recomendaciones	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción de las 3R	20
Tabla 2 Taxonomía D. rerio.....	22
Tabla 3 Tamaño y capacidad de peceras para distintos estadios de pez cebra.....	28
Tabla 4 Composición de stocks para el medio embrionario E2.....	30
Tabla 5 Composición del medio embrionario E2.....	30
Tabla 6 Parámetros fisicoquímicos del agua.....	41
Tabla 7 Variables de la viabilidad de embriones.....	42
Tabla 8 Variables de la viabilidad de embriones.....	44
Tabla 9 Caracterización de la relación peso-longitud	48
Tabla 10 Recuento de UFC (UFC/mg) en alevines 16 días post fecundación.....	50
Tabla 11 Recuento de UFC (UFC/mg) del órgano intestino en estadio juvenil 42 días post fecundación.....	51
Tabla 12 Recuento de UFC (UFC/mg) del órgano intestino en estadio adulto 124 días post fecundación.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución natural del pez cebra.....	23
Figura 2 Medidas de estanterías.....	27
Figura 3 Peceras de mantenimiento.....	32
Figura 4 Cámaras de reproducción.....	33
Figura 5 Configuración de peceras destinada a alevines.....	33
Figura 6 Embriones fertilizados y no fertilizados.....	34
Figura 7 Órganos de larvas transcurrido 3 días después de la fecundación.....	35
Figura 8 Órganos de alevines y peces adultos.....	36
Figura 9 Visualización de la parte interna de un pez adulto.....	37
Figura 10 Peceras para el desarrollo larvario y juvenil.....	39
Figura 11 Peceras de desarrollo adulto.....	40
Figura 12 Métodos de reproducción.....	42
Figura 13 Desarrollo embrionario.....	44
Figura 14 Peso promedio al finalizar el ensayo.....	46
Figura 15 Longitud promedio al finalizar el ensayo.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medios de Cultivo.....	64
Anexo 2. Microorganismos aislados.....	65
Anexo 3. Registro de datos de peso.....	67
Anexo 4. Registro de datos de longitud.....	67
Anexo 5. Registro promedio semanal de pH durante la alimentación	68
Anexo 6. Registro promedio semanal de conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) durante la alimentación.....	68
Anexo 7. Registro promedio semanal de oxígeno disuelto ($\mu\text{S}/\text{cm}$) durante la alimentación.....	69
Anexo 8. Composición de alimentos comerciales	70
Anexo 9. Crecimiento bacteriano alevines.....	70
Anexo 10. Crecimiento bacteriano juveniles.....	72
Anexo 11. Crecimiento bacteriano adultos.....	73
Anexo 12. Resumen pruebas bioquímicas.....	74

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Problema de investigación

El lento desarrollo científico en América Latina ha retrasado la experimentación con animales (Romero et al., 2016). En la actualidad las investigaciones biomédicas, fitoquímicas y de toxicología han avanzado en la evaluación de extractos y metabolitos de plantas endémicas del Ecuador (Muñoz-Chamba, 2019; Navas-Flores et al., 2021; Santana et al., 2013). Sin embargo, encontrar un modelo adecuado para los ensayos ha sido una de las principales dificultades, pues es complejo establecer un modelo animal versátil, de fácil manejo, con características como homología genética, celular y fisiológica (Shanks et al., 2009).

Actualmente el proceso de investigación conlleva algunos desafíos como la limitación de fondos e infraestructura. Estas características generan la necesidad de optimizar recursos. De manera particular en Ecuador, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP), ubicado en Guayaquil busca solventar y promover la investigación científica proveyendo líneas animales murinas (ratas Wistar, ratones BALB/c, meriones unguiculatus), además, de servicio de asesoramiento especializado (INSPI, 2017).

En los portales web de instituciones de las Instituciones Universitarias de Las Américas Universidad Politécnica Salesiana, Universidad San Francisco de Quito, Universidad Central del Ecuador, Escuela Politécnica Nacional, Escuela Superior Politécnica del Litoral y Universidad Técnica de Ambato se ofertan investigaciones a nivel in vivo con murinos y peces (Romero et al., 2016). A pesar de ello en el Ecuador no se ha establecido regulaciones para el uso adecuado de las especies animales. En el 2015 la Universidad de las Américas en Quito, presentó el primer informe para verificar la normativa necesaria para comenzar con los ensayos en ratones, al contrario de las demás instituciones que no cuentan con normativas y protocolos verificados por entidades regulatorias (UDLA, 2015).

Varios estudios de modelos in vivo en el Ecuador se enfocan en la evaluación del potencial de extractos vegetales para aprovechar la biodiversidad. Esto ocurre con la investigación realizada por Peralta & Bravo, (2022) que tiene como objetivo evaluar el potencial de extractos de plantas endémicas en organismos modelo. Sin embargo, el mencionado campo de investigación es vasto, por ello es necesario el uso de modelos

animales. Por otra parte, instituciones educativas como la Universidad de Cuenca han implementado al pez cebra como modelo de experimentación, sin embargo, no se ha establecido controles sanitarios y líneas certificadas para el establecimiento y reproducción (Peñaherrera et al., 2016), pues la diversidad de parámetros omitidos, podrían repercutir en los resultados de las investigaciones.

Al no contar con líneas certificadas de peces cebra en el Ecuador, el uso de especímenes provenientes de tiendas de mascotas es común en establecimientos de investigación de educación superior. Esto ha desarrollado problemas genéticos, que afectan el desarrollo de las investigaciones, por tanto, buscar un proveedor con peces nativos o con una progenie adecuada es primordial para evitar problemas a la hora de implementar protocolos de bioactividad (Mrakov&c & Haley, 1979; Suurväli et al., 2019).

1.2 Justificación

El pez cebra es un espécimen que resiste bien el entorno de laboratorio, son ampliamente reconocidos por su uso en ensayos *in vivo*, tanto en estado adulto como embriones. Su uso está enfocado en campos como la biomedicina debido a su transparencia óptica, similitud con el genoma humano y manipulación genética (Gomes & Mostowy, 2020). *Danio rerio* cuenta con características como; el rápido desarrollo embrionario, fertilidad todo el año, mantenimiento económico a comparación de los mamíferos, pues no necesita de cuidados intensivos y el espacio donde reside es reducido (Delomas & Dabrowski, 2019).

En el Ecuador las escuelas de Educación Superior cuentan con una gran diversidad de estudios de índole biomédica, enfocados en probar extractos de plantas endémicas nativas de las distintas provincias. Para ello, es importante realizar ensayos en modelos con biología similar a la del ser humano. Por lo anteriormente descrito, *D. rerio* es un modelo viable para el desarrollo de estos estudios.

Como un ejemplo reciente se puede mencionar a la investigación de Peñaherrera et al., (2016) en la que se prueba el efecto antiinflamatorio de extractos de plantas provenientes de Azuay y Loja. Aprovechando la similitud del modelo animal con los mamíferos; su alta tasa de fecundidad, pequeño tamaño y rápido desarrollo externo. Promulga la investigación biomédica en el Ecuador en las distintas universidades para implementar nuevas directrices de investigación hacia la toxicología y genómica.

El uso de especímenes con bajo nivel de endogamia, es esencial para las investigaciones ya que disminuyen efectos adversos en el estado embrionario como mutaciones y anomalías en el comportamiento de natación. Para ello, se pretende controlar el uso de la progenie del pez cebra, para evitar trabajar con líneas con problemas genéticos (Mrakov&c & Haley, 1979; Suurväli et al., 2019).

La presente investigación propone la introducción del modelo animal *D. rerio* bajo condiciones de laboratorio tomando como base los lineamientos determinados por el ZIRC y la OECD acerca de los parámetros necesarios para el correcto mantenimiento y manejo. Esto genera una línea de investigación animal para futuros proyectos de bioactividad y toxicidad de compuestos procedentes de la flora endémica del Ecuador.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Estandarizar las condiciones de laboratorio para el establecimiento del modelo animal *Danio rerio*

1.3.2 Objetivos Específicos

- Diseñar una configuración de peceras que permita el correcto desarrollo y mantenimiento de la especie animal en el laboratorio.
- Establecer la mejor alternativa nutricional para el *D. rerio*.
- Desarrollar un manual de manejo y mantenimiento de *D. rerio* en condiciones de laboratorio.

1.4 Hipótesis o preguntas de investigación.

¿Es posible establecer condiciones fisicoquímicas y fisiológicas adecuadas para el mantenimiento, desarrollo y reproducción de *D. rerio*?

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Modelo animal

2.1.1 Generalidades

Los modelos animales son una herramienta para la ciencia desde el siglo XVI, sus características fisiológicas de comportamiento ayudan a entender el funcionamiento del ser humano (Wall & Shani, 2008). Su uso ha sido llevado a todos los campos de la investigación como la biomedicina, biología básica, inmunología y enfermedades infecciosas (Ericsson et al., 2013; Del Cañizo et al., 2008).

El modelo animal comprende una variable genética explicativa en torno a un rasgo fenotípico estudiado. Así el valor genético de la especie está dado por el efecto aditivo del genotipo en función de los rasgos expresados por el fenotipo medio de la población. Dependiendo de la investigación se puede utilizar distintos modelos (Wilson et al., 2010).

2.1.2 Las 3 R

Las 3R descritas por Russell y Brunch en 1959 establecen un compromiso con el bienestar animal en 3 aristas el remplazo, la reducción y el refinamiento descritas en la tabla 1 (Robinson et al., 2019). Cada una con un objetivo en común, proporcionar nociones humanistas en la investigación con vectores animales.

Tabla 1

Descripción de las 3R

Aristas	Convencional	Contemporáneo
Remplazo	Evitar o reemplazar el uso de animales.	Acelerar el desarrollo de modelos predictivos <i>in silico</i> .
Reducción	Minimizar el número de animales.	Mejorar el diseño de experimentos sólidos y reproducibles.
Refinamiento	Minimizar el daño hacia los animales.	Avanzar con el bienestar animal

Nota: Desarrolló de los conceptos contemporáneos de las 3R. Adaptado de Hartung, (2008).

Las definiciones originales no reconocen los avances científicos que han ayudado a los investigadores a generar soluciones hacia la población humana. Por tanto, el Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Investigación (NC3Rs) propone un enfoque contemporáneo para promulgar el avance científico y el cuidado adecuado de los animales, suponiendo técnicas de manejo y desarrollo que eviten la explotación y maltrato de los modelos (Clark, 2018; Prescott & Lidster, 2017).

2.1.3 Modelos utilizados

Los modelos más conocidos y utilizados son los mamíferos como primates, prosimios, ratones conejos y cobayos. Su manejo en investigaciones comprende detalles biológicos en anatomía, etología y fisiología, además, del mantenimiento y manejo necesarios para predecir respuestas humanas (Chatzigeorgiou et al., 2009; Shanks et al., 2009).

Los mamíferos como el ratón a lo largo de la historia han sido utilizados en el modelamiento de enfermedades humanas por su homología genómica, celular y fisiológica. Por otro lado, el grado de conservación funcional en los procesos biológicos celulares básicos entre mamíferos e invertebrados, sostienen que las enfermedades pueden ser modeladas con precisión en invertebrados como moscas y gusanos, sin embargo, carecen de muchas estructuras y sistemas de órganos importantes a la hora de analizar una enfermedad (Lieschke & Currie, 2007).

2.1.4 El pez cebra como modelo animal

Danio rerio parece combinar las mejores características de los demás modelos, pues al igual que moscas y gusanos se desarrolla externamente, dando paso a la manipulación y seguimiento embrionario en todas las etapas (Braems et al., 2021; O'Callaghan & Vergunst, 2010). Así mismo, al igual que los murinos puede ser utilizado con fines genéticos al comprender cerca del 70% de similitud genómica con el ser humano, adicional comprende factores potenciales como su tamaño y mayor cantidad de crías en menor tiempo, características que llevaron a posicionarse como nuevo modelo animal (Hoo et al., 2016).

En 1936 el pez cebra fue usado por primera vez para la experimentación embrionaria, sin embargo, en la década de los 60 comenzó el estudio que lo convertiría en un modelo excelente combinando dos características: su valor embrionario y genético convirtiéndolo en un sistema ideal para investigaciones. Flinn et al., (2008) analizó el sistema nervioso dopaminérgico caracterizado a nivel de embriones y adultos, ayudando a comprender las vías

moleculares del comportamiento neuronal de los vertebrados aspecto de gran interés para enfermedades como el Parkinson.

Kari et al., (2007) plantea el uso del *D. rerio* como un modelo biológico sencillo en estado embrionario para el estudio de enfermedades humanas, por su genoma completamente secuenciado, fácil reproducción y cantidad alta de embriones. Una de las principales ventajas de los embriones de pez cebra es su fisiología celular, pues la fertilización y desarrollo ocurren de forma externa, dando lugar a la manipulación y control de condiciones a nivel de laboratorio.

2.2 Pez cebra

2.2.1 Taxonomía

Danio rerio conocido como pez cebra pertenece a la familia de peces de agua dulce *Cyprinidae-Danionidae*, orden *Cypriniformes*, clase *Actinopterygii*, subclase *Osteichthyes* descritos en la *tabla 2* (Meyer et al.,1993; Praveenraj et al., 2017). El nombre *danio* deriva del Bengali “dhani” que significa campo de arroz. El tamaño es de alrededor 3-5cm con un distintivo de franjas oscuras alternas (Spence et al., 2007).

Tabla 2

Taxonomía D. rerio

Taxonomía	
Nombre común	Pez cebra
Nombre científico	<i>Danio rerio</i>
Reino	Animalia
Genero	<i>Danio</i>
Familia	<i>Danionidae</i>
Subfamilia	<i>Danioninae</i>
Orden	<i>Cypriniformes</i>
Suborden	<i>Cyprinoidei</i>
Superorden	<i>Cypriniphysae</i>
Clase	<i>Actinopterygii</i>
Superclase	<i>Osteichthyes</i>

Nota: Descripción del linaje del pez cebra. Adaptado de NCBI: txid7955

2.2.2 Distribución y habitat

El pez cebra es endémico de Asia se encuentra distribuido en los ríos y cuencas fluviales de India, Nepal, Pakistán y Bengladesh descritos en la Figura 1 (Sundin et al., 2019; Lawrence, 2007). Se ha reportado sus avistamientos en cuerpos de agua estancados, bordes de acequias y campos de arroz, importante asociación relacionada con el uso de fertilizantes que promueven el crecimiento de zooplancton, factor importante en el crecimiento de peces pequeños (Spence et al., 2007)

Figura 1

Distribución natural del pez cebra.



Tomado de: Spence et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio* (2007).

La presencia de *D. rerio* en ambientes naturales está caracterizada por lugares con vegetación sobresaliente, agua corriente poco profunda y sustratos arenosos. La eliminación de vegetación y secado de arroyos presentan ausencia de la especie en zonas de Maghalaya (Arunachalam et al., 2013) a consecuencia de perturbaciones del ambiente, así pretende ser una especie de llanura aluvial (Spence et al., 2007).

2.2.3 Condiciones de laboratorio

El ciclo de vida de *D. rerio* comprende cuatro estadios principales: embrión, larva, alevín y adulto, comprendido en un tiempo de 4 meses. El desarrollo embrionario comienza cerca de las 24 horas tras la fecundación. Durante todo el año son fértiles, además, no cuentan con una estación del año específica para la reproducción, ventaja importante para el establecimiento y propagación (Kari et al., 2007; Rocha et al., 2002).

La Universidad Estatal de Ohin en el 2018, propone parámetros de laboratorio fisicoquímicos, tales como el fotoperiodo 13 horas de luz y 11 horas de oscuridad sincronizados con el amanecer natural a temperatura constante de 28 grados centígrados, similar al ambiente del sureste asiático de donde son originarios (Delomas & Dabrowski, 2019; Uusi-Heikkilä et al., 2010). Rocha et al., (2002) menciona características similares donde, adicional ajusta el pH de 7,4 –7,6 y agua de grifo declorada con tiosulfato sódico cambiada semanalmente, con el fin de mantener condiciones constantes que no afecten el metabolismo del pez.

Para la reproducción Uusi-Heikkilä et al., (2010) recomienda separar machos y hembras con el fin de controlar la reproducción, además de utilizar mallas de 2mm para evitar el canibalismo de los adultos al momento del desove, así mismo el lavado por triplicado con MBS a pH 7,4 (Rocha et al., 2002), de los embriones fertilizados, no obstante, Kent et al., (2014) menciona una alternativa con concentraciones de cloro 100 ppm sin utilizar ningún tampón durante 10 minutos, para después ser incubados durante 6 días.

2.2.4 Alimentación

En las últimas décadas *D. rerio* ha tomado gran impacto como modelo animal dentro de investigaciones biomédicas y disciplinas científicas. A medida que la demanda del modelo animal aumenta es necesario estandarizar metodologías que permitan la obtención de ejemplares sanos (Watts et al., 2016). La práctica de alimentación en el laboratorio al inicio tenía como objetivo el crecimiento y función reproductora asemejando escenarios a estudios orientados hacia el crecimiento en los distintos estadios. En su hábitat natural se ha reportado el consumo de crustáceos, gusanos y larvas de insectos (Lawrence, 2007), de allí su uso en el control de mosquitos. Sin embargo, a nivel experimental se probó su alimentación con algas acuáticas *Cladophora sp*, *Microsorium sp* (Rocha et al., 2002), alimentos comerciales como Tetracolor con un aporte nutricional del 47,5% en proteína bruta (Santos et al., 2019) y

Tetramin con un 46% de proteína bruta (Siccardi et al., 2009). Para disminuir el factor contaminante por microorganismos oportunistas y de primer grado los alimentos comerciales ofrecen un valor nutricional adecuado y ambiente estéril (Folwer et al., 2019) ideal para el desarrollo de investigaciones.

2.3 *Danio rerio* en la ciencia

El uso del pez cebra en investigaciones biomédicas lo ha convertido en el organismo por excelencia en estudios enfocados en la reproducción. Hoo *et al.*, (2016) estudió las características de comportamiento y cortejo, simulando mecanismos subyacentes del sistema reproductivo humano. Los resultados contribuyeron avance en el desarrollo de medicamentos y tecnologías de fertilidad.

Una característica importante de *D. rerio* es su genoma similar al del ser humano, por ello, su histología y comparaciones gen a gen supondrían comportamientos parecidos. La investigación realizada por Lam y Gong, (2006) analiza similitudes moleculares entre el modelo animal y la neoplasia hepática humana. El análisis arrojó semejanzas moleculares en la progresión de tumores hepáticos, identificando 406 características genéticas desconocidas sin homología con proteínas ya identificadas, no obstante, los genes desconocidos se encuentran entre los más diferencialmente expresados.

En el campo de la toxicología durante los últimos años se han publicado estudios para trabajos multigeneracionales y transgeneracionales, tal es el caso de atrazina que genera alteraciones morfológicas en larvas en su primera progenie. Por otro lado, al alimentar a adultos de *D. rerio* con leucomas de metilmercurio se encontraron malformaciones, disminución de respuestas visuales y una expresión genética alterada en la progenie de los especímenes. Al analizar su genoma, se obtuvo cambios transgeneracionales en la metilación de ADN tras la exposición a las sustancias activas (Horzmann & Freeman, 2018).

El pez cebra ha sido aplicado en el análisis de receptores nucleares relacionados con una amplia gama de procesos biológicos. Schaaf, (2017) estudia los receptores de ácido retinoico, receptores de estrógeno y receptores activados por proliferadores de peroxisomas; ilustrando la versatilidad y ventajas del sistema animal *D. rerio*, mostrando alto rendimiento de la actividad de los ligandos endógenos y exógenos. Se espera potenciar el uso de peces mutantes y transgénicos en el modelo del pez cebra.

Los lncRNA están relacionados con diversos procesos biológicos, por ello se analizó perfiles de expresión rítmica en diferentes órganos del pez cebra, no obstante, la regulación de lncRNA dista de ser completa. Para el estudio se utilizó larvas, identificando diversidad lncRNA expresados en funciones cardiacas, así mismo, se predijo modelos 3D de péptidos codificados en larvas circadianas, posteriormente examinando los dominios en la plataforma Protein Data Bank en condiciones de luz y oscuridad constante (Mishra *et al.*, 2021).

Un aspecto importante para el mantenimiento de especies en general es la endogamia. Mrakovc & Haley, (1979) estudiaron la depresión consanguínea del pez cebra, observando una caída del 50% en la fecundidad, adicional se encontraron cerca de 327 mutaciones y anomalías de comportamiento en el movimiento de natación. La importancia del estudio de la variabilidad genética va ligada al genotipo, a pesar del uso de modelos animales endogámicos en laboratorio, se ha obtenido ventajas al tener clones exactos y usarlos como controles de experimentación (Suurväli *et al.*, 2019)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del área de estudio

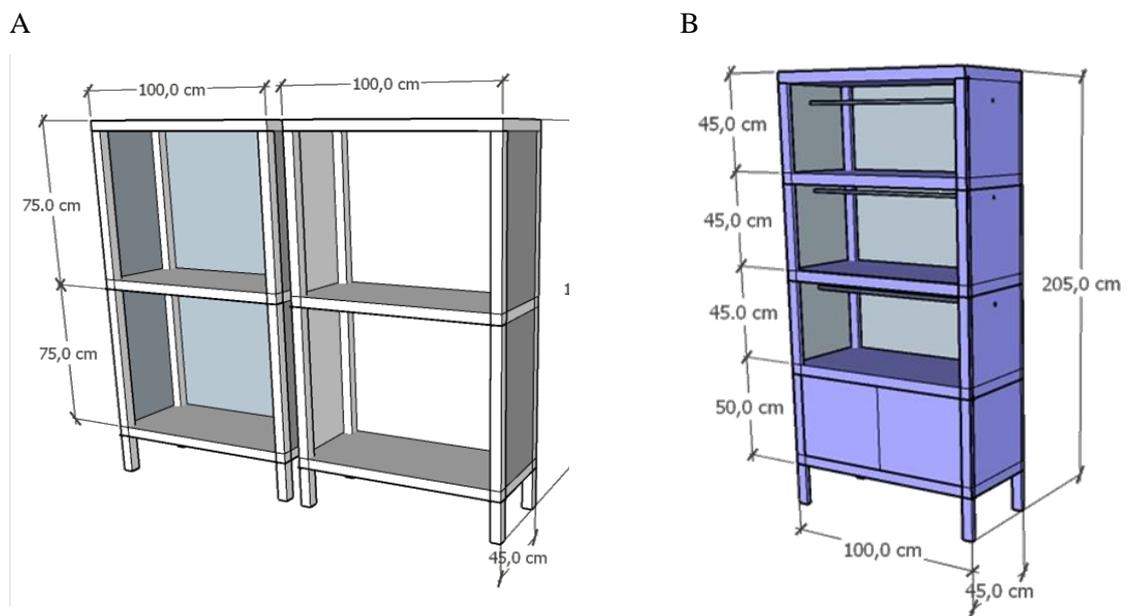
La investigación se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Técnica del Norte, laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente a la carrera de Ingeniería en Biotecnología, ubicada en el campus San Vicente de Paul en la provincia de Imbabura, cantón Ibarra, parroquia El Sagrario.

3.1.1 Distribución del lugar

El lugar donde se estableció la investigación comprende un espacio de 3m de largo y 2.2m de ancho. En el cual se adecuó 2 estanterías de 2 niveles destinadas al mantenimiento de peces adultos, juveniles y sistema de reproducción como se muestra en la figura 2A. Por otro lado, se estableció una estantería de 4 niveles destinada a la incubación de embriones y desarrollo de alevines (figura 2B).

Figura 2

Medidas de estanterías



Nota: A: estanteria de mantenimiento; B: estantería de alevines

3.2 Configuración del sistema de peceras

Para el cuidado del modelo animal *Danio rerio* se utilizaron peceras construidas en vidrio templado. La capacidad del estanque dependió del estadio en el que se encuentre el espécimen. En el caso de peces adultos se consideró 1 litro por espécimen, para juveniles 5 especímenes por litro y 150 alevines por litro como se describe en la tabla 3 (Kari et al., 2007; Paige et al., 2014; Rocha et al., 2002).

Tabla 3

Tamaño y capacidad de peceras para distintos estadios de pez cebra.

Estadio	Especímenes	Profundidad (cm)	Ítulo (cm)	Áltura (cm)	Volumen Ocupado (L)	Volumen Total (L)
Adultos	25	23,9	3	3	25,0	30,0
Alevines	750	28,0	2	2	5,0	11,0
Cámara de reproducción	3	24,0	1	1	4,0	4,0

La parte superior de las peceras de mantenimiento de adultos marca SOBO T630F se encuentran cubiertas por acrílico, con un sensor de temperatura suspendido 15cm desde la tapa y una lámpara multicolor LED de 4,3W con una longitud de onda de 768 luxes. Por otro lado, para las peceras destinadas a alevines y reproducción se empleó una configuración tradicional con una tapa de vidrio en la parte superior, acompañado de una lámpara LED de 18W marca Volton con un flujo luminoso de 400 luxes.

3.1.2 Sistema de aireación

Para el sistema de aireación se usó una bomba de aire SOBO SB-668, con potencia de 8W y presión de 0,012MPa. Con una manguera de intercambio de oxígeno de 4mm de diámetro y un difusor de oxígeno ZACRO.

3.1.3 Filtros y termostato

Cada pecera contó con su propio mecanismo de filtración de agua interno WP-320F de marca SOBO con capacidad máxima de 50 litros y un termostato SEA STAR con amplitud de 32°C.

3.3 Desinfección del sistema de peceras

El lugar y estanterías se desinfectaron utilizando alcohol al 70% y cloro al 5%. Así mismo, las peceras y equipos internos (termostato, difusor de oxígeno y filtro) se esterilizaron con etanol al 70%, hipoclorito de sodio 50ppm y agua estéril proveniente de un sistema de osmosis inversa (Avdesh et al., 2012).

3.4 Procesamiento del agua

Dependiendo del estadio se utilizaron distintas formulaciones de agua acorde a sus requerimientos y tolerabilidad. Es posible utilizar agua común declorada o envejecida en todas las etapas del pez cebra. No obstante, Zebrafish International Resource Center (ZIRC) divide la preparación de agua en 2 fases alevín y juvenil/adulto.

La fase de alevín es el estadio más complejo en la vida del pez cebra, siendo susceptible a enfermedades y alteraciones en el medio. Por ello, se estableció formulaciones comerciales específicas para el desarrollo y crecimiento en la primera etapa. El medio comercial embrionario E2 al no encontrarse distribuido en el Ecuador se formuló con stock de sales, siguiendo el protocolo establecido por el ZIRC, (2022).

Tabla 4*Composición de stocks para el medio embrionario E2.*

Stock	Sales	Peso (g)	Volumen (mL)	Concentración (mM)
EA2 (1000X)	NaCl	8,750	100	1500
	KCl	0,375		50
	MgSO ₄ *7H ₂ O	2,465		100
	E2A Buffer Mix	2 mL		-
E2A Buffer Mix	KH ₂ PO ₄	10,210	100	15
	Na ₂ HPO ₄	6,700		5
E2B (500X)	CaCl ₂	3,675	50	500
E2C (500X)	NaHCO ₃	2,940	100	350
0,1% Azul de metileno	Azul de metileno (Biobloo 1%)	10 mL	100	-

Nota: Stocks para la formulación del medio E2. Adaptado de protocolos de viveros de peces del ZIRC, (2022).

Se preparó cada stock de acuerdo con el volumen establecido en la tabla 4, diluyendo las sales para esterilizar la solución en la autoclave a 121°C por 15min, posterior a ello, se almacenó a 4°C. La formulación se ajustó para la preparación 20L de medio embrionario E2 tomando volúmenes del stock descritos en la tabla 5. Si ajustó el pH con HCl y NaOH hasta obtener valores medios de 6,90-7,10.

Tabla 5*Composición del medio embrionario E2.*

Medio E2	
Stock	Volumen (mL)
Agua de osmosis inversa	19850
EA2 (1000X)	100
E2B (500X)	20
E2C (500X)	20
0,1% Azul de metileno	10

Nota: Medio E2. Adaptado de protocolos de viveros de peces del ZIRC, (2022).

Para la etapa de juvenil/adulto el agua común se almacenó en un recipiente de 18 galones, tratado con 250uL tiosulfato de sodio al 1%, 250uL de azul de metileno al 2% y esterilizado con una lámpara UV sumergible de 11W por 24 horas. El pH del agua se ajustó a 6.90-7.10 utilizando bicarbonato de sodio, la conductividad se mantuvo en el rango de 400-500 microsiemens con ayuda de la sal comercial Bio Salt Plus de Biobloo, la salinidad se mantuvo entre a 250-300 mg/L con NaCl al 95% grado alimenticio y el oxígeno disuelto mayor a 6 mg/L a través de una piedra difusora. Parámetros medidos con un multiparámetro C600 y medidor de oxígeno disuelto DO9100 (Avdesh et al., 2012; Rocha et al., 2002).

3.5 Obtención de especímenes

Para la investigación se adquirió 50 ejemplares en proporciones de sexo 1:1, de los establecimientos Orfish, Bluefish y Aventura Acuática. Estos peces se almacenaron en peceras de volúmenes de 30 litros. Se obtuvo especímenes de 3 a 4 meses de edad, identificados por su longitud media de 3cm. Los especímenes se trasladaron en bolsas de viaje SERA suministradas con oxígeno, aglutinante de amoníaco y selladas al vacío, agregados en un recipiente aislante de espuma flex para evitar cambios bruscos de temperatura y daños de los especímenes.

3.5.1 Aclimatación

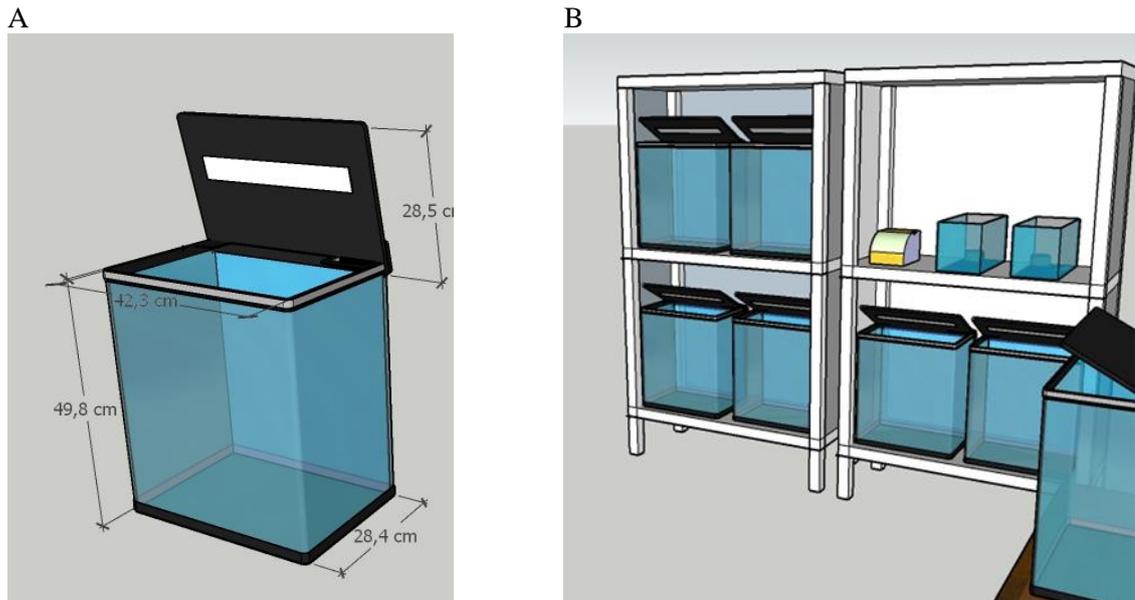
Una semana antes del traslado se prepararon las peceras limpiándolas con una solución de etanol al 70% e hipoclorito de sodio 50ppm, enjuagándola con agua destilada y tiosulfato de sodio al 1%. El fotoperiodo fue de 10:14 (luz/oscuridad), controlado a través de lámparas LED con una temperatura de color de 6000k y un rango de 750-800 luxes. La conductividad se ajustó a 600uS con ayuda de sal marina SERA y se midió monitoreo durante 30 días. Al inicio no se controló la concentración de nitratos, sin embargo, se midió semanalmente. Los niveles de nitrato deben ser menores a 5mg/L, para el caso de los nitritos debe mantenerse en rangos nulos, medidos con un kit comercial SERA (Avdesh et al., 2012; Delomas & Dabrowski, 2019; Kari et al., 2007)

3.5.2 Disposición de peces

Los peces están separados dependiendo del sexo. Se utilizaron 6 peceras de mantenimiento 3 dispuestas para cada sexo con un aforo de 25 peces/L (figura 3).

Figura 3

Peceras de mantenimiento.



Nota: A: dimensiones pecera de mantenimiento SOBO 630T; B: sistema de peceras para tratamientos.

Transcurrido el tiempo de maduración sexual se utilizó una cámara de 15 litros con una división, donde se añadió 3 especímenes en proporción 2:1 (machos/hembra) en las primeras horas del día. Se probó la reproducción bajo 2 tipos de métodos malla y canicas como se observa en la figura 4. En el caso de los alevines al tener un menor tamaño se ubicó 10 peces/L en una pecera de 10 litros (figura 5A) con un difusor de oxígeno y un flujo de 2 burbujas por segundo (Avdesh et al., 2012; Rocha et al., 2002)

Figura 4

Cámaras de reproducción.

A



B

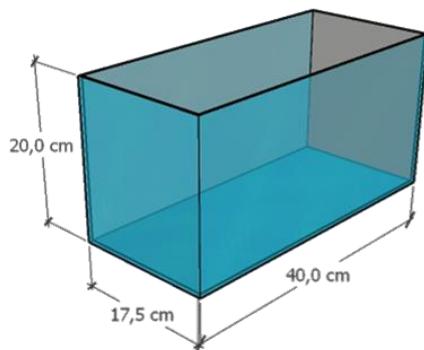


Nota: A: Método canicas B: Método malla. Figura elaborada por el autor

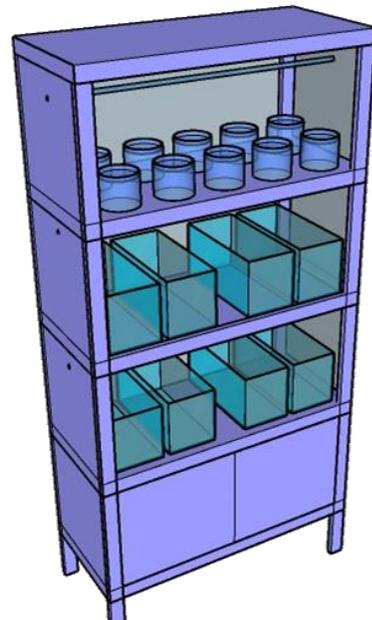
Figura 5

Configuración de peceras destinada a alevines.

A



B



Nota: A: dimensiones pecera tradicional; B: sistema de peceras de maternidad de alevines.

3.5.3 Reproducción

La reproducción se ejecutó con 2 especímenes machos y 1 hembra variedad salvaje, mismos que fueron separados una noche antes. Al encenderse las luces del área estos fueron juntados durante el periodo de 1 hora, se utilizó una rejilla de 3 mm, para evitar la pérdida de huevos por canibalismo. Los embriones se recolectaron con una pipeta Pasteur una vez finalizada la reproducción y fueron trasladados a cajas Petri estériles con agua del sistema principal de mantenimiento (Avdesh et al., 2012).

3.5.3.1 Desinfección de embriones

Los embriones fueron desinfectados dentro de la cámara de flujo laminar, donde se efectuó el lavado con una solución de azul de metileno al 0.1% e hipoclorito de sodio 50ppm. Para eliminar restos de las soluciones desinfectantes se realizó lavados por triplicado con agua destilada estéril y una solución de tiosulfato de sodio al 1% (Winn et al., 2021).

Tras haber realizado el lavado de los embriones se observó bajo el microscopio invertido en el aumento de 10x los embriones viables (figura 6). Para posteriormente ser encubados a 26 °C en el medio embrionario E2 durante 96 horas (Kent et al., 2014; Rocha et al., 2002). Monitoreados en periodos de 4 horas durante el día, eliminando embriones con núcleos coagulados periódicamente.

Figura 6

Embriones fertilizados y no fertilizados.



3.6 Alimentación

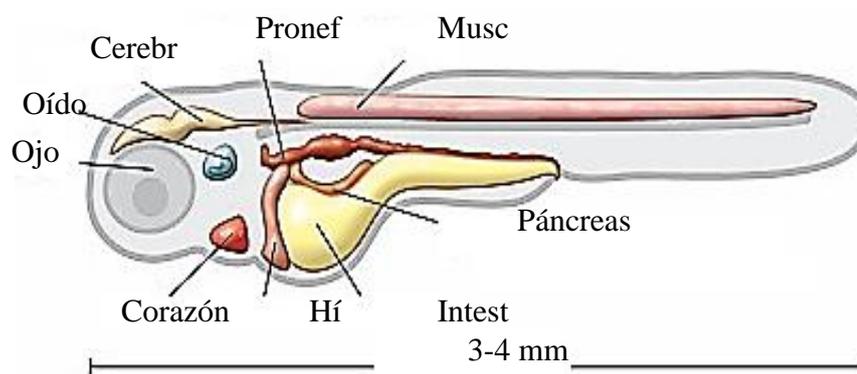
Un factor importante es la alimentación, *D. rerio* en su habitat natural suelen cazar su comida. Por ello se evaluó 3 tipos de alimentación, uno vivo (*Artemia salina*) y 2 comerciales (Tetracolor y Espirulina liofilizada). El alimento se calculó tomando el 4% del peso corporal por día y se suministró a partir del primer mes de vida. Para poder evaluar la eficiencia del tratamiento se analizó las variables peso y tamaño de 10 especímenes cada 15 días. Para medir la variable peso se utilizó un tamiz para extraer los peces del acuario y la balanza analítica para poder evidenciar las variaciones de peso. En el caso del tamaño se usó una cinta métrica tomando en cuenta la parte de la cabeza hasta el final de la cola (Avdesh et al., 2012; Lawrence, 2007).

3.7 Fisiología

El análisis fisiológico se lo realizó a partir de la obtención de los primeros embriones, donde se analizó el desarrollo normal de los órganos a las 72 y 96 horas post fecundación (figura 7). Tomando 5 larvas en una caja petri de los 3 tratamientos utilizados, siendo inmovilizados a través de shock térmico a 0°C en un recipiente con gel packs y agua común (Lukasz & Kindt, 2018). Para posteriormente ser visualizados con el microscopio invertido en el aumento de 10x.

Figura 7

Órganos de larvas transcurrido 3 días después de la fecundación.

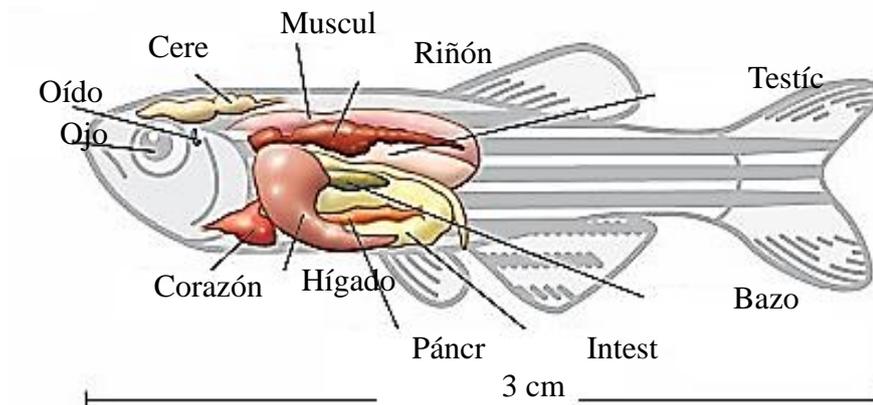


Recuperada de Santoriello y Zon, (2012).

Mientras los alevines crecen en un lapso de 4 meses se llevó cabo el análisis morfológico cada mes tomando 1 espécimen y realizando la autopsia a través de un corte lateral en la cavidad celómica para acceder al interior y obtener muestras del riñón, bazo e intestino (figura 8). (Palacios H. et al., 2015).

Figura 8

Órganos de alevines y peces adultos.



Recuperada de Santoriello y Zon, (2012)

3.8 Microbiología

Las enfermedades comunes que afectan a los peces en laboratorio corresponden a infecciones relacionadas con bacterias oportunistas. La evaluación patógena se inspeccionó cada mes para especímenes que presenten signos de enfermedad como falta de apetito, hematomas, llagas, deformidades de la columna, deterioro de las aletas y escamas.

3.1.4 Recolección de la muestra

Se realizó la toma de muestras de tejido cutáneo afectado y tejido interno (bazo, intestino, riñón). En caso de no presentar síntomas de enfermedad de forma preventiva se realizó la toma al azar de un espécimen por pecera para la evaluación.

El espécimen seleccionado se sometió a eutanasia siendo trasladado a un recipiente de orina estéril con 50mL de agua del sistema principal, sumergiéndolo en agua común con gel packs a 0°C durante 15 minutos. Posteriormente se lo depositó en una caja Petri estéril (Gupta y Mullins, 2010).

Para toda la disección se utilizó guantes de latex desinfectados con etanol al 70%. Antes de ingresar a la parte interna del pez se realizó un lavado de la parte externa con etanol al 70% (Cantas et al., 2012). La extracción de órganos bazo, riñón e intestino se realizó con ayuda del estereoscopio a través de un corte lateral con tijeras planas angulares de 0.35mm para ser trasladados a eppendorfs estériles (figura 9).

Figura 9

Visualización de la parte interna de un pez adulto.



3.1.5 *Procesamiento de la muestra*

Cada órgano se pesó en recipientes plásticos estériles por separado y se suspendieron en tubos de ensayo de 5mL con un contenido de agua peptona (TM Media®) de 2mL. Se dejó reposar durante 30 min y con ayuda de un micropistilo se trituró, posteriormente se lo llevó al Vortex durante 1 min (Cantas et al., 2012) En el caso de alevines se suspendió todo el cuerpo y se empleó la misma metodología.

3.1.6 *Aislamiento de microorganismos*

De las muestras procesadas se procedió a sembrar por triplicado con la técnica de siembra por extensión con asa de Drigalsky en los medios selectivos agar EMB, Agar Aeromona Pseudo Selectivo, Agar manitol Saldado, Agar cetrimida y Middlebrook 7h9, a razón de 50uL por caja y se dejó en incubación durante 24 horas. No obstante, en el caso del medio Middlebrook 7h9 se incubó durante 5 días (Orjuela et al., 2021). Los medios de cultivo

utilizados permitieron la diferenciación de microorganismos gram positivos y negativos presentes en el ambiente estructural del pez cebra (Anexo 1). Además, se efectuó la resiembra por estriado de las colonias morfológicamente diferentes, para obtener cepas puras (Anexo 2).

3.9 Elaboración de manual de manejo y mantenimiento del pez cebra en condiciones de laboratorio

El manual se realizó considerando parámetros estándares, protocolos, metodologías de desarrollo y reproducción del pez cebra bajo condiciones controladas en el laboratorio, mismas que fueron evaluadas y estandarizadas de acuerdo con el espacio y disponibilidad de equipos en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte.

3.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la investigación fueron analizados a través de un diseño completamente al azar (DCA) en el programa InfoStat/L. Considerando los factores de estudio del primer objetivo: la configuración de filtros del sistema de mantenimiento, sistemas de reproducción del pez cebra y temperatura. Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey para datos que se ajustan a los supuestos (normalidad- homocedasticidad) con un $\alpha=0.05$. Por otra parte, para los datos que no cumplen con los supuestos se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza de $\alpha=0.05$.

En el caso del factor de estudio de alimentación del segundo objetivo se aplicó un ANOVA ($\alpha=0.01$) para la variable de respuesta peso y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.01$) para la longitud. Por otra parte, para la identificación de especies microbianas se utilizó la transformación raíz cuadrada más 0.5, con la finalidad de disminuir los coeficientes de variación y ajustar los datos para realizar las pruebas estadísticas ANOVA y Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.01$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Descripción general del sistema de peceras

La instalación consta de tanques individuales acorde al estadio de los especímenes. Para larvas y juveniles se estableció el uso de peceras tradicionales de 10L, acompañados de un filtro de esponja (figura 10). En el caso de los peces adultos se utilizaron peceras prefabricadas de 25L con un sistema de filtración interno basado en recirculación mostrado en a la figura 11.

Figura 10

Peceras para el desarrollo larvario y juvenil.



El sistema elemental de alojamiento del pez cebrá establecido proporciona un macroentorno estable, a través de un método estático de intercambio de agua con recambios semanales del 30% y mensuales del 50%. El área está orientada a investigaciones que involucran embriones, por ello se utiliza tanques individuales con filtración independiente que controlan la calidad del agua en torno a sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Trevarrow, 2004; Brand et al., 2002).

Figura 11

Peceras de desarrollo adulto.



Los alevines durante su primera etapa de vida no requieren de espacios grandes, debido al desgaste energético que puede generar la búsqueda de alimento influyendo muchas veces en su supervivencia (Augustine et al., 2011). Por ello se estableció el uso de 8 peceras de 10L, para elaborar un sistema intensivo de cría de peces cebra, además esto ayudó a evitar la propagación de enfermedades al mantener en un sistema cerrado e independiente entre sí. En el caso de las peceras de mantenimiento se estableció el uso de 7 peceras de 30L, acorde al diseño experimental alimenticio propuesto. No obstante, de forma preventiva se usó una de ellas como pecera hospital en caso de observar algún espécimen con padecimiento que comprometa su salud.

4.2 Química del agua

En la tabla 6 se exponen los parámetros diarios que se obtuvieron durante 12 semanas a 23 ± 1 C°, correspondientes a los dos tipos de filtración empleados en estanques de mantenimiento de adultos con una densidad poblacional baja de 25 peces.

Tabla 6

Parámetros fisicoquímicos del agua.

Configuración	pH	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)	OD (mg/L)
FF	7.7 \pm 0.2	475.5 \pm 57.7	6.9 \pm 0.5
FM	7.6 \pm 0.3	488.1 \pm 63.3	7.0 \pm 0.5

Nota: FF: Filtros prefabricados; FM: Filtros modificados; \pm : Desviación estándar

Como se observa en la tabla, el promedio de las mediciones diarias de pH para los 2 tipos de filtro se encuentra dentro del rango óptimo 6.5-8.5, establecido por el organismo regulador del pez cebra ZIRC, (2022) y las directrices de la OECD, (2013), lo cual demuestra la estabilidad del parámetro dentro del sistema estático de intercambio de agua.

En el caso de la conductividad el resultado para el filtro prefabricado (FF) es de 475.5 \pm 57.7 y el filtro modificado (FM) 488.1 \pm 63.3 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, que al igual se mantiene dentro de los límites recomendados de 300-1000 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ (OECD, 2013). En cuanto al oxígeno disuelto los valores se encuentran en torno a 6-7mg/L con valores medios para FF de 6.9 \pm 0.5 y 7.0 \pm 0.5 para FM. Una vez evaluado las condiciones se determinó que todos parámetros se encuentran en rangos que no afecten y comprometan el bienestar de la especie dentro del sistema propuesto.

Lekang & Kleppe, (2000) en su estudio mencionan la importancia de la matriz filtrante biológica en sistemas de cría de peces, ya que al igual que una planta de tratamientos de agua necesita estar bien establecido y ser eficiente en el manejo de compuestos amoniacales. El filtro modificado que incorpora material filtrante Matrix confiere características beneficiosas como la esterilización mediante el autoclave y reutilización, en contraste al filtro comercial de un solo uso. Proporcionando Beneficios económicos a largo plazo y evitando la acumulación de contaminantes químicos y microorganismos oportunistas.

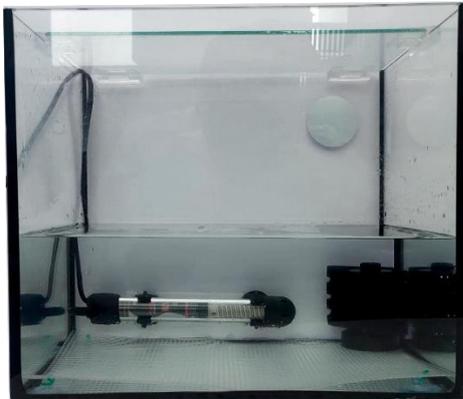
4.3 Reproducción

A continuación, se detallan los resultados de reproducción bajo 2 configuraciones de peceras, canicas y malla (figura 12). Además del efecto de la temperatura a 23 ± 1 y 26 ± 1 °C valorando la viabilidad de embriones en cada caso.

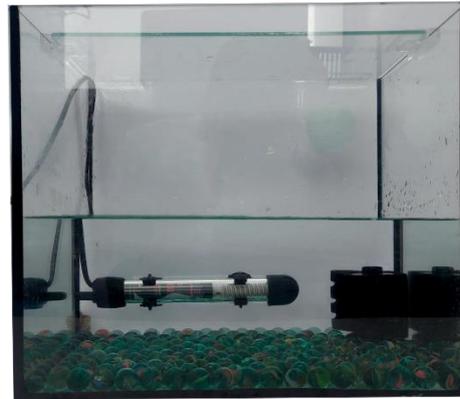
Figura 12

Métodos de reproducción.

MA



CA



Nota: MA: malla; CA: canicas

4.3.1 Validez del método de reproducción

En la tabla 7, se exponen los datos de viabilidad embrionaria tomadas a temperatura ambiente (23 ± 1 °C) en los métodos de reproducción. Por medio de la cuantificación de embriones eclosionados a las 72 y 96 horas post fecundación, además, del porcentaje de mortalidad.

Tabla 7

Variables de la viabilidad de embriones.

Configuración	% Embriones eclosionados		% Mortalidad
	72 hpf	96 hpf	
CA	38.8 ^b	3.9	57.4 ^a
MA	54.0 ^a	3.2	42.8 ^b

Nota: CA: canicas; MA: malla; hpf: horas post fecundación

Los valores obtenidos en la tabla 1 se alcanzaron a través de la recolección de 500 embriones viables por semana durante el periodo de un mes. Se encontraron diferencias significativas ($F=11.6$; $gl=1, 78$; $p<0.01$) en el porcentaje de embriones eclosionados a las 72 hpf considerando los 2 métodos de reproducción propuestos, donde se estableció que la configuración malla tuvo un promedio de eclosión mayor con un valor del 54% a comparación del método canicas con un 38.8%.

El primer método para la reproducción del pez cebra en condiciones de laboratorio incluye el uso de canicas, cuya función es evitar el consumo de los embriones liberados al caer en los espacios inaccesibles para los peces (Gonsar et al., 2012). La metodología es eficiente Spence et al., (2007) menciona la preferencia de oviposición de hembras en sustratos semejantes al limo como las canicas. Sin embargo, la recolección de embriones es compleja y genera daños estructurales disminuyendo la cantidad de embriones con un desarrollo en torno a las 96 horas.

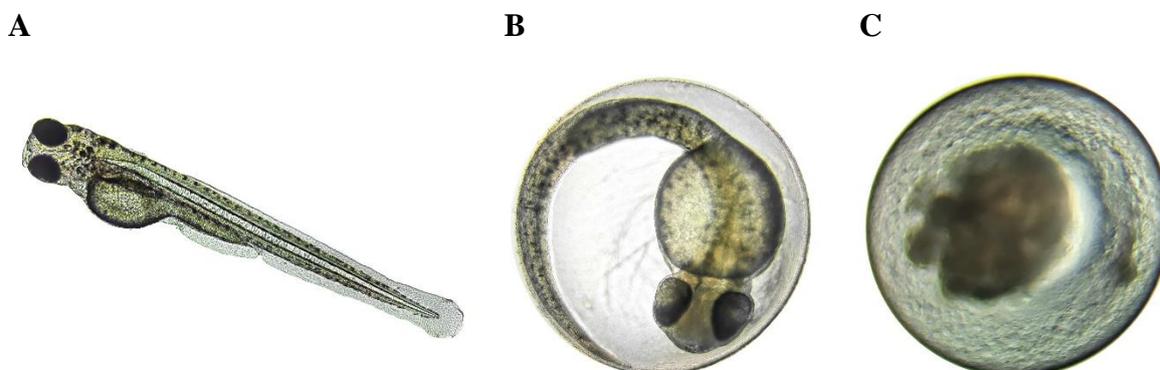
Por otro lado, se ha demostrado que la metodología de reproducción utilizando como separador de fondo a la malla plástica, ayuda a aumentar la cantidad de embriones eclosionados a las 72 horas post fecundación. Nasiadka & Clark, (2012) determinó el uso de separadores plásticos como la configuración más conveniente para la recolección de embriones, factor importante para evitar daños tisulares en el corion.

De acuerdo con los resultados obtenidos del porcentaje de mortalidad de alevines eclosionados a las 96 horas post fecundación. La prueba de Kruskal Wallis determinó que existen diferencias significativas ($H=7.68$, $gl=1, 78$; $p>0.01$) entre los métodos de reproducción. Se reporta un porcentaje mayor del 57.4% para el método CA en comparación al 42.8% obtenido a través de la metodología MA.

El pez cebra se desarrolla rápidamente en un lapso de 48 a 96 horas en condiciones controladas (Kimmel et al., 1995; D'costa & Shepherd, 2009), el porcentaje de mortalidad se analizó en torno a los embriones de lento desarrollo y coagulación del núcleo (figura 13) en el lapso estimado por la OECD, (2013) de 96 horas. De acuerdo con el porcentaje de mortalidad la metodología con menor valor corresponde al MA. La recolección de embriones es compleja y genera daños a nivel de corion, al utilizar un componente de separación fácil de remover se evita la coagulación del núcleo generado por el contacto directo con sustancias de desinfección como el hipoclorito de sodio y azul de metileno, resultado de afecciones externas del embrión (Nasiadka & Clark, 2012).

Figura 13

Desarrollo embrionario



Nota: A: Alevín 72 horas post fecundación; B: Embrión con desarrollo lento 96 horas post fecundación; C: Embrión con el núcleo coagulado.

4.3.2 Evaluación de la temperatura en la reproducción

Fueron seleccionados 500 embriones fecundados por semana durante tres periodos e incubados a dos temperaturas (23 ± 1 y 26 ± 1 C°) bajo la metodología de reproducción MA, se observó el desarrollo de los embriones a las 72 y 96 horas post fecundación, además del porcentaje de mortalidad.

Tabla 8

Variables de la viabilidad de embriones.

Temperatura C°	% Embriones eclosionados		% Mortalidad
	72 hpf	96 hpf	
23±1	55.87 ^a	4.00 ^a	40.13 ^a
26±1	86.00 ^b	0.60 ^b	13.40 ^b

Nota: hpf: horas post fecundación

El éxito de eclosión se identificó comprobando el comportamiento estereotipado secuencial al liberarse del corion: contracciones alternas, enrolladas espirales y natación organizada (Saint-Amant & Drapeau, 1998). La prueba de Kruskal Wallis determinó diferencias significativas en el porcentaje de embriones eclosionados a las 72 horas post fecundación ($H=26.17$, $gl=1$, 58 ; $p>0.01$). De acuerdo con la tabla 8 existe un porcentaje

mayor 86.00% de embriones eclosionados bajo la temperatura 26 ± 1 C° en comparación al 55.87% obtenido a 23 ± 1 C°.

De acuerdo con los resultados obtenidos la temperatura afecta a la tasa de desarrollo embrionario normal del pez cebra a las 72 horas post fecundación. López & Sánchez, (2011) afirman que a temperaturas menores de 25 °C la tasa de desarrollo se ve afectada, disminuyendo el tiempo de formación de la larva de pez cebra, sin mostrar la aparición de malformidades. Mientras que a mayor a temperatura el desarrollo ocurre más rápido al disminuir el periodo de somatogénesis dando como resultado aumentos del 30,13% en el éxito de formación de larvas viables sin problemas fisiológicos.

En cuanto al porcentaje de embriones eclosionados a las 96 horas post fecundación se reportó diferencias significativas a través de la prueba Kruskal Wallis ($H=6.67$, $gl=1$, 58; $p>0.01$). Se observó un retraso de eclosión mayor en los ensayos a 23 ± 1 C° con un 4.00% a diferencia del 0.60% reportado a 26 ± 1 C°. Schröter et al., (2008) reporta un fuerte efecto de la temperatura en la velocidad general de desarrollo. Estas diferencias en la velocidad de desarrollo podrían explicarse por los efectos proporcionales en el periodo de somatogénesis a temperaturas entre el rango de 20°C y 30°C determinando un aumento lineal a lo largo del tiempo en todo el tronco del pez, que ayudan a regular los relojes circadianos de los alevines en sus primeras horas de vida.

Se encontraron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad ($F=33.20$, $gl=1$, 58; $p>0.01$). Transcurrido las 96 horas de desarrollo se notó la presencia de embriones no eclosionados y con el núcleo coagulado. Se observó una baja mortalidad del 13.49% a 26 ± 1 C°, por otra parte, a 23 ± 1 C° se alcanzó una mortalidad mayor del 40.13%.

Estos resultados se relacionan con el estudio de Schnurr et al., (2014), donde concluyó que el desarrollo embrionario exitoso depende de la temperatura ubicando rangos de 18 a 32 °C para obtener tasas de mortalidad media del $\leq 12\%$ en condiciones ideales y del 60% a 23 °C. Se observó un comportamiento similar reportado por Schmidt & Starck, (2010) disminuyendo el porcentaje de mortalidad a medida que se acerca 30°C demostrando que la temperatura influye en el desarrollo y mortalidad del pez cebra.

4.4 Alimentación

Durante el periodo de estudio Noviembre 2023- Febrero 2024 se analizaron 150 peces cebra variedad salvaje distribuidos en 3 tratamientos cada uno con una repetición. Los principales parámetros descriptivos de las poblaciones peso y longitud se registraron cada 15 días tomando 10 peces por repetición (Anexo 3 y 4). Además de la relación longitud-peso y factor de condición de Fulton al finalizar la evaluación alimenticia con Artemia Salina, Espirulina y Tetracolor.

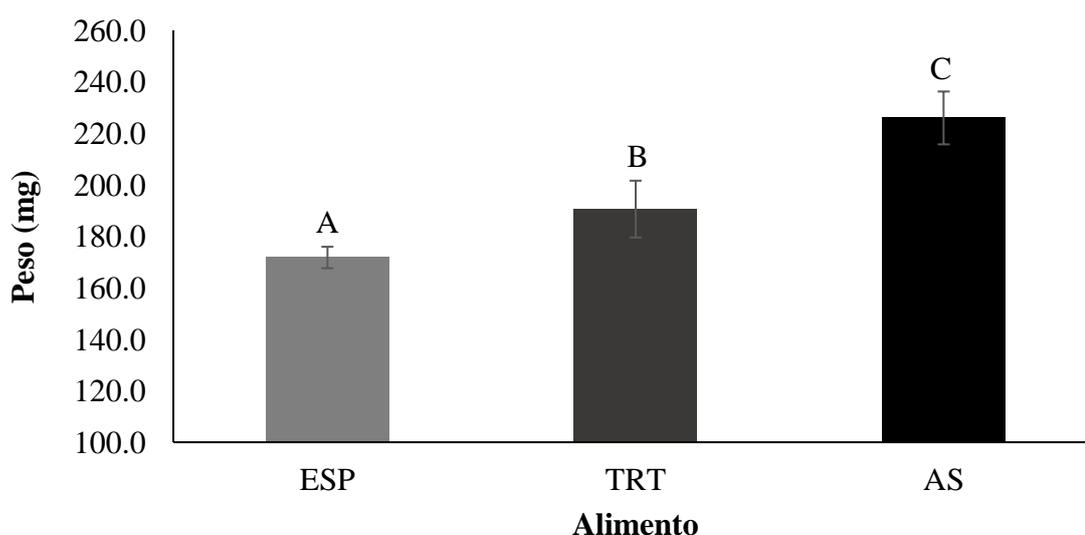
Para ayudar a mantener la calidad del agua se realizó un intercambio del 25% cada 2 días y un 50% al finalizar la semana, además de sifonear los tanques diariamente. Los parámetros de la calidad del agua durante el experimento se detallan los Anexos 5,6 y 7.

4.4.1 Peso y longitud

Como se muestra en la figura 14 se encontraron diferencias significativas ($F=350.36$, $gl=57$, $p<0.001$) en el peso de los peces cebra tras haber sido alimentados con 3 dietas, 2 comerciales Espirulina (ESP) y Tetracolor (TRT) y una viva Artemia Salina (AS), obteniendo un peso mayor con la dieta de AS consiguiendo un valor medio de 226.0 ± 10.1 mg al día 124 post fecundación. En el caso de las dietas comerciales se reportó valores de peso inferiores de 171.8 ± 3.9 y 190.6 ± 2.5 mg para ESP y TRT respectivamente.

Figura 14

Peso promedio al finalizar el ensayo.

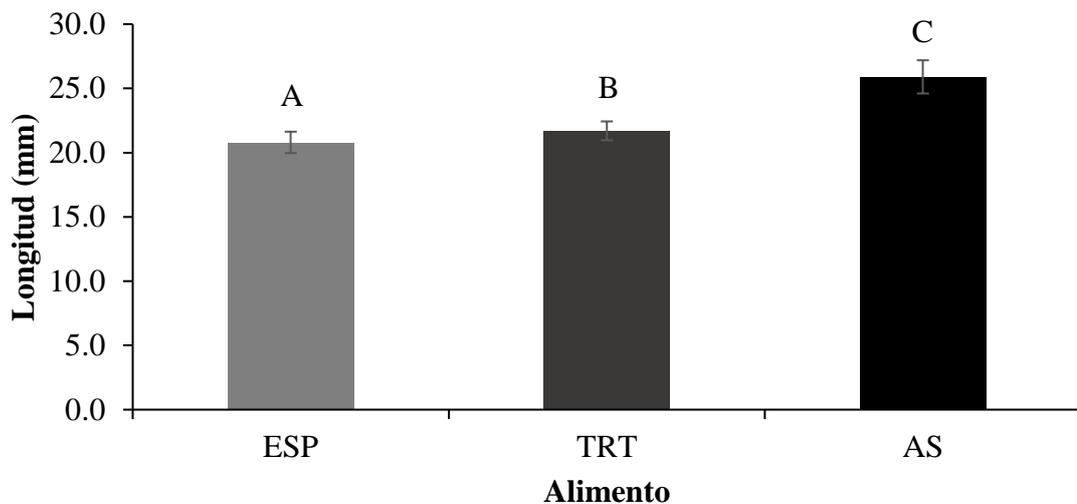


Nota: ESP: espirulina; TRT: tetracolor; AS: artemia salina

De acuerdo con la figura 15 la prueba de Kruskal Wallis determinó que existen diferencias significativas ($H=42.89$, $gl=57$, $p>0.001$) entre las longitudes alcanzadas a los 124 dpf del pez cebra, siendo AS el tratamiento alimenticio que presentó mayor longitud (25.9 ± 1.3 mm), mientras que las dietas comerciales ESP y TRT mostraron valores menores de 20.8 ± 0.8 y 21.7 ± 0.7 .

Figura 15

Longitud promedio al finalizar el ensayo.



Nota: ESP: espirulina; TRT: tetracolor; AS: artemia salina

Las principales dietas formuladas en la actualidad se centran en la cantidad de proteína cruda disponible para la ingesta del pez, responsable de la mayor parte de crecimiento de masa corporal magra expresados como un aumento de peso (Watts et al., 2016). El estudio realizado por Fowler et al., (2019) compara dietas comerciales con una viva donde en términos de peso y longitud el suministro de artemia salina favorece el aumento de peso del pez cebra en la etapa de crecimiento exponencial fase juvenil. Sin embargo, a medida que este llega a la etapa adulta supone un déficit de nutrientes específicos que se encuentran en el microcrustáceo, de tal forma en la investigación se validan los resultados obtenidos a través de la ingesta de alimento vivo alto en proteína en comparación de alimentos procesados como Tetramin similar al Tetracolor.

En el caso del perfil nutricional de la ESP (Anexo 8) a pesar de tener un valor proteico bajo en comparación a TRT alcanza niveles cercanos de peso y longitud. Li et al., 2022 atribuye el correcto desarrollo a ácidos grasos poliinsaturados n-3 (ácido γ -

linoleico), vitaminas y minerales propios de la especie. Sin embargo, el formulado liofilizado que se utilizó en el estudio no es 100% puro, razón por lo cual las variables son menores en comparación a los demás tratamientos.

Es importante mencionar la presentación del alimento comercial, al ser pelets y alimento comprimido, tienden a permanecer en la superficie más tiempo lo cual ayuda a la limpieza y control de parámetros del agua que influyen directamente en el consumo de alimento (Lawrence, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que la ingesta de alimento vivo estimula el comportamiento e instinto de caza favoreciendo la salud del pez cebra (Aoyama et al., 2015; Spence, 2011).

Cave recalcar que aún no existe una dieta estándar para el crecimiento y mantenimiento del pez cebra en condiciones de laboratorio, sino distintas formulaciones comerciales que permiten mantener metodologías de alimentación sencillas que no generan resultados de investigación confusas a partir del perfil nutricional (Siccardi et al., 2009; Goolish et al., 1999).

4.4.2 *Relación peso longitud*

Los valores del coeficiente de determinación R^2 de la relación peso y longitud mostraron una analogía alta ($R^2 > 0.70$) entre las variables de estudio para todos los tratamientos alimenticios. Donde se mostró crecimiento alométrico positivo manteniendo el coeficiente “b” con valores superiores a 3 en todos los casos (tabla 9).

Tabla 9

Caracterización de la relación peso-longitud

Tratamiento	Ecuación	R^2	b	K
ESP	$y = 5.6599x + 1.0291$	0.9350	5.6599	1.9087
TRT	$y = 5.3411x + 1.0509$	0.9293	5.3411	1.8650
AS	$y = 5.3411x + 1.0509$	0.9063	6.1733	1.3008

Nota: ESP: espirulina; TRT: tetracolor; AS: artemia salina; R^2 : coeficiente de correlación; b: coeficiente de crecimiento; K: factor de condición de Fulton

De acuerdo con los resultados obtenidos no se encuentran diferencias significativas en el coeficiente de crecimiento entre tratamientos. Bonilla et al., (2017) menciona que coeficientes de crecimiento mayores a 3 corresponden a casos donde los individuos incrementan su peso en mayor proporción que su longitud, dependiendo de la especie esto

puede generar problemas de salud. El trabajo de Rivera et al., (2023) sugiera un coeficiente b cercano a 3 para especies pequeñas, sin embargo, el aumento de peso puede ser explicado a través del porcentaje de ingesta de alimento diaria, siendo un problema la amplitud del rango sugerido del 2%-5% (Spence, 2010; Lawrence, 2007; Olascoaga & Luna, 2005). Lo que indica

Por otro lado, el factor de condición de Fulton comprende valores superiores a 1 (ESP: 1.9087; TRT: 1.8650; AS: 1.3008), lo cual indica un buen nivel de alimentación y condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo de los peces (Rivera et al., 2023). Si bien existen rangos establecidos del índice K para cada especie, en el caso del pez cebrino no ha sido evaluado a profundidad, no obstante, se ha observado máximos y mínimos de 0.83-2.94 (Clark et al., 2018).

El estudio realizado por Froese, (2006) atribuye valores altos del índice de condición al número de hembras en cada estanque y al estadio cercano de reproducción, sin embargo, la dieta de AS comprende un índice cercano al recomendado en las especies pequeñas de 1.00-1.20 (Jones et al., 1999). Sin embargo, otros estudios no recomiendan el uso del factor de condición de Fulton si la especie comprende un crecimiento alométrico, ya que el análisis es propio de especies grandes (Regheb, 2023). Esto genera alteraciones en el indicador de alimentación dentro de los experimentos, siendo una limitante en la evaluación de alimentación.

En los peces el aumento de peso es considerado como criterio de referencia para determinar el éxito y fracaso de una dieta experimental (Watts & D'Abramo, 2021). No obstante, la variación de peso es solo un resultado y no abarca el punto de bienestar y salud.

Las diferencias observadas entre las dietas son muy importantes, ya que indican específicamente variación entre la alimentación aun incluso si los protocolos son idénticos. A pesar de que la artemia salina comprende valores superiores en todos parámetros morfométricos, su empleo dentro del laboratorio se ve limitado por el costo elevado de producción, donde, el tratamiento con tetracolor tiende a solucionar este aspecto sin generar variaciones dentro de la tasa de crecimiento y el factor de condición. Siendo la dieta más equilibrada para el uso dentro de ensayos experimentales.

4.5 Identificación de especies microbianas

Durante el periodo de evaluación alimenticia se realizó el aislamiento de especies bacterianas que pueden comprometer la salud del pez cebrino en los 3 estadios de crecimiento alevín, juvenil y adulto. Con el fin de identificar vectores de contaminación alimenticia.

4.5.1 Alevín

En la tabla 10 se muestra las entidades microbianas identificadas durante la primera etapa de vida de los especímenes, evaluados bajo el mismo proceso de manejo y control de calidad de agua. Donde se encontraron diferencias significativas ($F=5.42$; $gl=15$; $p<0.05$) en el aislamiento de *Aeromona hydrophila*, obteniendo mayores valores en Las peceras 2 y 3(48.3 y 42.2 UFC/mg).

Tabla 10

Recuento de UFC (UFC/mg) en alevines 16 días post fecundación.

Agente	Medio de cultivo	Peceras		
		1	2	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	EMB	4.3	0.0	7.0
<i>Klebsiella aerogenes</i>	EMB	27.8	23.8	18.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EMB	25.2	27.0	34.3
<i>Aeromona hydrophila</i>	APS	23.0 ^a	48.3 ^b	42.2 ^b
<i>Pseudomona aruginosa</i>	APS	27.2	20.8	23.7
<i>Pseudomona aruginosa</i>	CT	8.2	12.2	18.2

Nota: EMB: eosina y azul de metileno; APS: aeromona pseudo selectivo; CT: cetrimida

De acuerdo con el estudio realizado por Cantas et al., (2012) las especies bacterianas identificadas en la tabla 10 son catalogadas como especies no patógenas o potencialmente patógenas oportunistas, que pueden encontrarse dentro de las instalaciones de crecimiento del pez cebra.

Al encontrarse en la primera etapa de vida la probabilidad de mortalidad de los peces es alta, la mayor parte de los patógenos bacterianos se encuentran en el medio acuático, donde la patogénesis bacteriana involucra la virulencia del organismo invasor como la susceptibilidad del pez (Matthews, 2004). No obstante, no se registraron bajas en la primera fase de vida de los especímenes a pesar de encontrarse en presencia de patógenos oportunistas. Es importante mencionar solo la presencia de bacterias gram negativas en la evaluación microbiológica realizada, ya que la especie acuícola es resistente a bacterias gram negativas acuáticas oportunistas (Petrie et al., 2007).

4.5.2 Juvenil y adulto

Al analizar los órganos internos (riñón, bazo e intestino) se identificaron presuntamente la presencia de microorganismos solo en el intestino (Anexo 8 y 9) en ambos estadios. Los agentes infecciosos presentes en la tabla 11 fueron encontrados con antelación en el primer estadio alevín. Cabe mencionar que el agua utilizada para el mantenimiento y recambio fue tratada con luz ultravioleta, la cual ayuda a disminuir la carga bacteriana del agua corriente y no elimina por completo los microorganismos presentes (Cantas et al., 2012).

Tabla 11

Recuento de UFC (UFC/mg) del órgano intestino en estadio juvenil 42 días post fecundación.

Agente	Medios de cultivo	Alimentación		
		ESP	TRT	AS
<i>Klebsiella aerogenes</i>	EMB	21.2 ^a	5.5 ^b	3.0 ^b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EMB	3.7	3.3	2.8
<i>Salmonella shigella</i>	EMB	0.0 ^a	0.0 ^a	28.3 ^b
<i>Aeromona hydrophila</i>	APS	8.5 ^a	15.5 ^{ab}	19.7 ^b
<i>Pseudomona aruginosa</i>	APS	10.2	8.2	9.2
<i>Pseudomona aruginosa</i>	CT	0.0 ^a	6.5 ^b	0.0 ^a

Nota: ESP: espirulina; TRT: tetracolor; AS: artemia salina; EMB: eosina y azul de metileno; APS: aeromona pseudo selectivo; CT: cetrimida

Los peces al día 42 fueron trasladados a las peceras de mantenimiento y suministradas las respectivas dietas de alimentación. Breen et al., (2019) atribuye el mantenimiento del microbiota estructural del pez cebr a la interacción agua- huésped, donde a pesar de ser cambiados de sistema el microbiota abundante es persistente y resistente a perturbaciones, dando como resultado el mantenimiento de los agentes *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromona hydrophila* y *Pseudomona aruginosa*. De acuerdo con los resultados obtenidos se encontraron diferencias significativas en el conteo de colonias de *Klebsiella aerogenes* (F=16.86; gl= 15; p<0.001) obteniendo mayor presencia de carga bacteriana en el tratamiento ESP con 21.2 UFC/mg. Cabe señalar que el género *Klebsiella* es transmitida por medio de la manipulación humana, por tanto, el vector de contaminación

principal es el lugar de suministro de agua, principalmente engranajes donde se forman biopelículas (Young et al., 2020).

La presencia de *Salmonella shigella* se evidenció solo en la alimentación suplementada con artemia salina, mostrando significancia estadística a través de la prueba Kruskal Wallis ($H=11.37$; $gl=15$; $p<0.001$), con una carga bacteriana de 28.3 UFC/mg. Un posible vector de contaminación son los quistes de artemia, el estudio realizado por Redondo et al., (2008) muestra la prevalencia de patógenos potenciales en sistemas de producción de alimento vivo acuícola, donde a pesar de mantener estándares de inocuidad alimenticia se identificó la presencia de especies de *Salmonella*.

En el caso de *A. hydrophila* se encontraron diferencias significativas ($F=4.48$; $gl=15$; $p<0.05$) en el conteo de unidades formadoras de colonia considerando los alimentos suministrados. Se observó similitud para 2 tipos de tratamientos ESP y TRT mediante el rango de significancia a, sin embargo, la presencia de colonias fue mayor en la alimentación AS resultado de la manipulación y posible alimentación no esterilizada como es el caso de los quistes antes de eclosionar.

Tabla 12

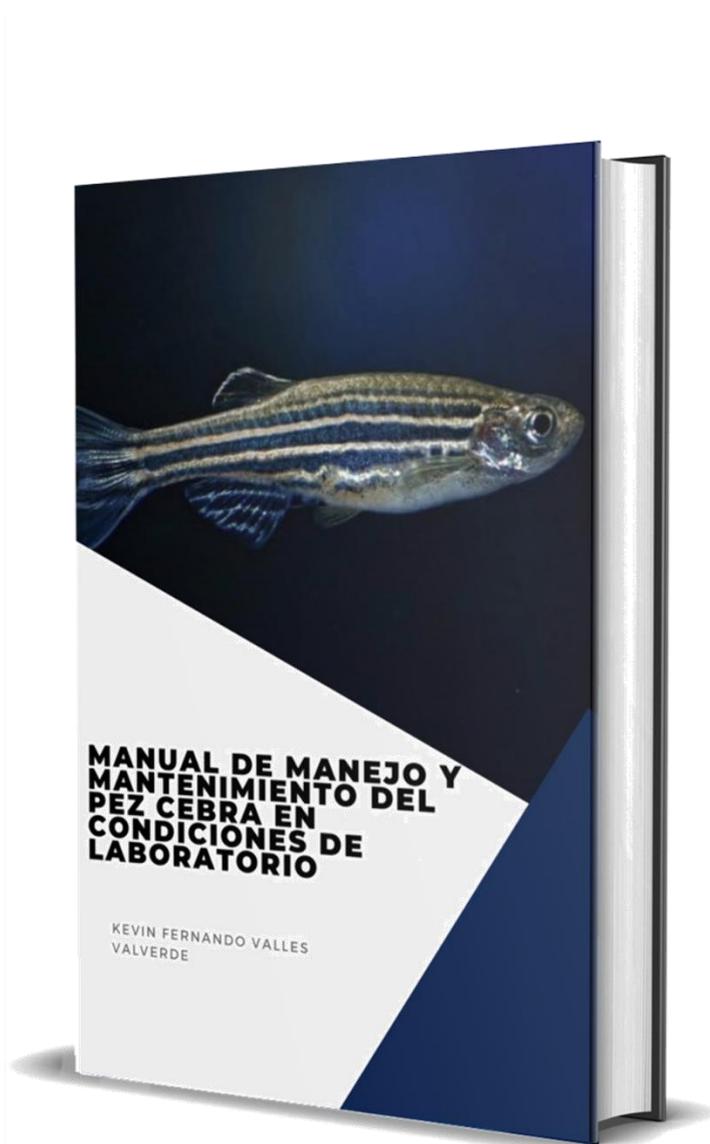
Recuento de UFC (UFC/mg) del órgano intestino en estadio adulto 124 días post fecundación.

Agentes	Medios de cultivo	Alimentación		
		ESP	TRT	AS
<i>Klebsiella aerogenes</i>	EMB	35.5 ^a	8.5 ^{ab}	22.7 ^b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EMB	0.0 ^a	12.2 ^b	8.8 ^b
<i>Pseudomona aruginosa</i>	EMB	36.8 ^a	10.2 ^b	2.3 ^c
<i>Salmonella shigella</i>	EMB	20.3 ^a	3.8 ^b	4.0 ^b
<i>Escherichia coli</i>	EMB	0.0 ^a	1.5 ^b	0.0 ^a
<i>Aeromona hydrophila</i>	APS	0.8 ^a	16.7 ^b	25.5 ^b
<i>Pseudomona aruginosa</i>	APS	59.3 ^a	15.7 ^b	10.3 ^b
<i>Pseudomona aruginosa</i>	CT	0.0 ^a	0.0 ^a	4.2 ^b

Nota: ESP: espirulina; TRT: tetracolor; AS: artemia salina; EMB: eosina y azul de metileno; APS: aeromona pseudo selectivo; CT: cetrimida

La tabla 12 nos muestra el microbiota del pez cebra al finalizar el ensayo. Se encontraron diferencias significativas en todos los microorganismos *klebsiella aerogenes* (F=3.37; gl=15; p<0.05), *Klebsiella pneumoniae* (F=31.10; gl=15; p<0.005), *Pseudomona aruginosa* EMB (F=35.95; gl=15; p<0.005), *Salmonella shigella* (F=8.66; gl=15; p<0.05), *Escherichia coli* (F=16.00; gl=15; p<0.05), *Aeromona hydrophila* (F=13.75; gl=15; p<0.05), *Pseudomona aruginosa* AST (F=33.09; gl=15; p<0.05) y *Pseudomona aruginosa* CT (F=34.23; gl=15; p<0.05). No obstante, no se identificó un patrón evidente para determinar la causa específica de los valores de unidades formadoras de colonias. Es importante resaltar la ausencia de peces mostrando signos de enfermedades bacterianas, sin embargo, los agentes oportunistas pueden mostrarse, si los parámetros de las colonias de peces se ven comprometidos o manipulados de manera errónea generando estrés crónico resultando en la supresión inmune.

4.6 Manual de manejo y mantenimiento del pez cebra



ENLACE DE ACCESO AL MANUAL

[MANUAL DE MANEJO Y MANTENIMIENTO DEL PEZ CEBRA.docx](#)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El presente estudio permitió la creación de un sistema de peceras prefabricadas de vidrio templado tipo batch, utilizando como principal material filtrante biológico matrix de seachem.
- La artemia salina es la mejor alternativa alimenticia a partir de las variables morfométricas peso-longitud y coeficientes de condición. Alcanzando el peso al cabo de 124 días de 226.0 ± 10.1 mg y una longitud media de 25.9 ± 1.3 mm. Sin embargo, de manera económica no es la opción más viable a largo plazo, donde Tetracolor pretende ser el alimento más balanceado en resultados morfométricos y económicos para el mantenimiento del pez cebra.
- El manual de manejo y mantenimiento del pez cebra en condiciones de laboratorio contiene los siguientes capítulos: Generalidades, Introducción de especímenes, Instalaciones, Sistema de obtención de embriones y alimentación.

5.2 Recomendaciones

- Optimizar el sistema mecánico de manejo y limpieza de desechos.
- Implementar sistemas de recirculación.
- Evaluar la alimentación de tratamientos por triplicado.
- Determinar posibles vectores de contaminación de agentes patógenos en el área y alimento suministrado al pez cebra.
- Identificar microorganismos a través de técnicas de PCR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoyama, Y., Moriya, N., Tanaka, S., Taniguchi, T., Hosokawa, H., & Maegawa, S. (2015). A novel method for rearing zebrafish by using freshwater rotifers (*Brachionus calyciflorus*). *Zebrafish*, *12*(4), 288-295.
- Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., & Mayden, R. L. (2013). Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*, *10*(1), 1-14.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Floriani, M., Adam-Guillermin, C., & Kooijman, S. A. (2011). Developmental energetics of zebrafish, *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *159*(3), 275-283.F
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., & Martins, R. N. (2012). Regular Care and Maintenance of a Zebrafish in Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*, *69*. <https://doi.org/10.3791/4196>
- Bonilla, J. A., Mayer, P., Estruch-Fuster, V. D., & Jover-Cerdá, M. (2017). Cambios en el índice de condición y relación longitud-peso durante el ciclo de crecimiento de la dorada (*Sparus aurata* L.) en jaulas marinas. *AquaTIC*, (47), 20-31.
- Braems, E., Tziortzouda, P., & Van Den Bosch, L. (2021). Exploring the alternative: Fish, flies and worms as preclinical models for ALS. *Neuroscience Letters*, *759*, 136041.
- Brand, M., Granato, M., & Nüsslein-Volhard, C. (2002). Keeping and raising zebrafish. *Zebrafish*, *261*, 7-37.
- Breen, P., Winters, A. D., Nag, D., Ahmad, M. M., Theis, K. R., & Withey, J. H. (2019). Internal versus external pressures: effect of housing systems on the zebrafish microbiome. *Zebrafish*, *16*(4), 388-400.
- Cantas, L., Sørby, J. R. T., Aleström, P., & Sørum, H. (2012). Culturable Gut Microbiota Diversity in Zebrafish. *Zebrafish*, *9*(1), 26–37. doi:10.1089/zeb.2011.0712
- Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., kalafatakis, K., & Kamper, E. (2009). The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. *In vivo*, *23* (2), 245-258.
- Clark, J. M. (2018). The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition*, *120*(s1), S1-S7.

- Clark, T. S., Pandolfo, L. M., Marshall, C. M., Mitra, A. K., & Schech, J. M. (2018). Body condition scoring for adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 57(6), 698-702.
- D'costa, A., & Shepherd, I. T. (2009). Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish*, 6(2), 169-177.
- Del Cañizo López, J.F., López Martín, D., Lledó García, E., y García Barreno, P.. (2008). Diseño de modelos experimentales en investigación quirúrgica. *Actas Urológicas Españolas*, 32(1), 27-40.
- Delomas, T. A., & Dabrowski, K. (2019). Improved protocol for rapid zebrafish growth without reducing reproductive performance. *Aquaculture Research*, 50(2), 457–463. <https://doi.org/10.1111/are.13912>
- Ericsson, A., Crim, M., & Franklin, C. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri medicine*, 110(3), 201–205.
- Flinn, L., Bretaud, S., Lo, C., Ingham, P. W., & Bandmann, O. (2008). Zebrafish as a new animal model for movement disorders. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 106, Issue 5, pp. 1991–1997). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05463.x>
- Fowler, L. A., Williams, M. B., Dennis-Cornelius, L. N., Farmer, S., Barry, R. J., Powell, M. L., & Watts, S. A. (2019). Influence of commercial and laboratory diets on growth, body composition, and reproduction in the zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish*, 16(6), 508-521.
- Froese, R. (2006). Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of applied ichthyology*, 22(4), 241-253.
- Gomes, M. C., & Mostowy, S. (2020). The Case for Modeling Human Infection in Zebrafish. In *Trends in Microbiology* (Vol. 28, Issue 1, pp. 10–18). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.005>
- Gonsar, N., Schumann, A. C., Buchard, J. N., & Liang, J. O. (2012). An inexpensive, efficient method for regular egg collection from zebrafish in a recirculating system. *Zebrafish*, 9(1), 50-55.
- Goolish, E. M., Okutake, K., & Lesure, S. (1999). Growth and survivorship of larval zebrafish *Danio rerio* on processed diets. *North American Journal of Aquaculture*, 61(3), 189-198.

- Gupta, T., & Mullins, M. C. (2010). Dissection of organs from the adult zebrafish. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (37), e1717.
- Hartung, T. (2008). Thoughts on limitations of animal models. *Parkinsonism & related disorders*, 14, S81-S83.
- Hoo, J. Y., Kumari, Y., Shaikh, M. F., Hue, S. M., & Goh, B. H. (2016). Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research. In *BioMed Research International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/9732780>
- Horzmann, K. A., & Freeman, J. L. (2018). Making Waves: New Developments in Toxicology with the Zebrafish Running Title: New Developments in Toxicology with Zebrafish Introduction-Zebrafish in Toxicology. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy044/4870163>
- INSPI. (2017). INSPI CONMEMORA 9 AÑOS DE CREACIÓN INSTITUCIONAL. www.investigacionosalud.gob.ec/inspi-conmemora-9-anos-de-creacion-institucional/
- Jones, RE, Petrell, RJ y Pauly, D. (1999). Uso de relaciones longitud-peso modificadas para evaluar la condición de los peces. *Aquacultural Engineering*, 20(4), 261–276. doi:10.1016/s0144-8609(99)00020-5
- Kari, G., Rodeck, U., & Dicker, A. P. (2007). Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery. In *Clinical Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 82, Issue 1, pp. 70–80). <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100223>
- Kent, M. L., Buchner, C., Barton, C., & Tanguay, R. L. (2014). Toxicity of chlorine to zebrafish embryos. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107(3), 235–240. <https://doi.org/10.3354/dao02683>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310..
- Lam, S. H., y Gong, Z. (2006). Modeling Liver Cancer Using Zebrafish: A Comparative Oncogenomics Approach. *Cell Cycle*, 5(6), 573–577.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. In *Aquaculture* (Vol. 269, Issues 1–4, pp. 1–20). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- Lekang, O. I., & Kleppe, H. (2000). Efficiency of nitrification in trickling filters using different filter media. *Aquacultural engineering*, 21(3), 181-199.

- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 8, Issue 5, pp. 353–367). <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
- López, J. F., & Sánchez, F. J. (2011). Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Thermal Biology*, 36(2), 91-104.
- Lukasz, D., & Kindt, K. S. (2018). In Vivo Calcium Imaging of Lateral-line Hair Cells in Larval Zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, 141. <https://doi.org/10.3791/58794>
- Matthews, J. L. (2004). Common diseases of laboratory zebrafish. *Methods in cell biology*, 77, 617-643.
- Meyer, A., Biermann, C. H., & Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 252(1335), 231-236.
- Mishra, S. K., Zhong, Z., & Wang, H. (2021). Hundreds of IncRNAs display circadian rhythmicity in zebrafish larvae. *Cells*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/cells10113173>
- Mrakovc, M., & Haley, L. E. (1979). In breeding depression in the zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton Buchanan). In *J. Fish Biol* (Vol. 15).
- Muñoz-Chamba, W. (2019). Evaluación mutagénica y antimutagénica de extractos totales de plantas medicinales mediante el ensayo de retromutación en *Salmonella typhimurium*. Mutagenic and antimutagenic evaluation of total extracts of medicinal plants by the retromutation test in *Salmonella typhimurium*. 09(01), 35–41.
- Nasiadka, A., & Clark, M. D. (2012). Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR journal*, 53(2), 161-168.
- National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, (2023). Replacement, Reduction and Refinement. <https://nc3rs.org.uk/>
- Navas-Flores, V., Chiriboga-Pazmiño, X., Miño-Cisneros, P., & Luzuriaga-Quichimbo, C. (2021). Estudio fitoquímico y toxicológico de plantas nativas del oriente ecuatoriano. *CIENCIA UNEMI*, 14(35), 26–36. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol14iss35.2021pp26-36p>
- O’Callaghan, D., & Vergunst, A. (2010). Non-mammalian animal models to study infectious disease: worms or fly fishing?. *Current opinion in microbiology*, 13(1), 79-85.

- OECD. (2013). Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Obtenido de OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS: <https://www.oecdilibary.org/docserver/9789264203709en.pdf?expires=1657833856&id=id&a>
- Olascoaga, T. J., & Luna-Figueroa, J. (2005). Aprovechamiento de alimento vivo *Culex quinquefasciatus* en la dieta del pez cebra *Brachidanio rerio* (Pisces: Cyprinidae) con énfasis en la reproducción. *AquaTIC*, (22), 20-25.
- Orjuela Leguizamón, H. A., Pérez Guerra, J. R., & Pinzón Grisales, C. L. (2021). Micobacteriosis en peces ornamentales y su posible implicación en la salud pública. Revisión.
- Paige, C., Hill, B., Canterbury, J., Sweitzer, S., & Romero-Sandoval, E. A. (2014). Construction of an affordable and easy-to-build zebrafish facility. *Journal of Visualized Experiments*, 93. <https://doi.org/10.3791/51989>
- Palacios H., S., Sandoval C., N., Bueno M., C., & Manchego S., A. (2015). Estudio Microbiológico e Histopatológico en Peces Tetra Neón (*Paracheirodon innesi*) de la Amazonía Peruana. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(3), 469. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11176>
- Peñaherrera, E. J. A., MMaría de Lourdes Cuzco, Nancy Wilches, Isabel León Tamariz, Fabián Tobar Solano, & Vladimiro Alexis Expandir. (2016). 1_articulo_revista_14.
- Peralta Córdova, E. P., & Bravo Barbecho, E. H (2022). Optimización del modelo de pez cebra (*Danio rerio*) para toxicidad de extractos vegetales (Bachelor's thesis, Universidad de Cuenca).
- Petrie-Hanson, L., Romano, C. L., Mackey, R. B., Khosravi, P., Hohn, C. M., & Boyle, C. R. (2007). Evaluation of zebrafish *Danio rerio* as a model for enteric septicemia of catfish (ESC). *Journal of Aquatic Animal Health*, 19(3), 151-158.
- Praveenraj, J., Kiruba-Sankar, R., Roy, S. D., Lohith, K., Shailesh, K., Angel, J. R. J., & Thakur, R. V. (2017). *Danio rerio* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae): A new record from Andaman Islands, India. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 47(4), 391-396.
- Prescott, M. J., & Lidster, K. (2017). Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Lab animal*, 46(4), 152-156.
- PubMed of the National Center for Biotechnology Information (NCBI):

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (acceso 04 de octubre del 2023).

- Redondo, P. N., Dosta, C. M., & Jarero, J. R. (2008). Evaluación de la calidad bacteriológica del alimento vivo (*Artemia*, *Daphnia*, *Tenebrio* y *Tubifex*) para peces en los sitios de su recolección, producción y venta. *Veterinaria México*, 39(3), 255-268.
- Rivera, G., Aguilar-Ballinas, J. M., Trejo-González, C., & Peralta-Meixueiro, M. Á. (2023). Estructura de tallas, relación longitud-peso y factor de condición de cuatro peces nativos en la represa Nezahualcóyotl, Chiapas, México. *Caldasia*, 45(2), 323-331.
- Robinson, N. B., Krieger, K., Khan, F. M., Huffman, W., Chang, M., Naik, A., ... & Gaudino, M. (2019). The current state of animal models in research: A review. *International Journal of Surgery*, 72, 9-13.
- Rocha, A., Ruiz, S., & Coll, J. M. (2002). Método sencillo para producir huevos embrionados de pez cebra. In *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim* (Vol. 17, Issue 2). <http://www.san->
- Romero-Fernandez, W., Batista-Castro, Z., de Lucca, M., Ruano, A., García-Barceló, M., Rivera-Cervantes, M., García-Rodríguez, J., & Sánchez-Mateos, S. (2016). The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation. In *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* (Vol. 33, Issue 2, pp. 288–299). Instituto Nacional de Salud. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.332.2169>
- Santana, P. M., León, T. O., Martínez, M. M., Payrol, J. A., Ruíz, O., & García, E. L. P. (2013). Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.(Asteraceae) endémica de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 131-139.
- Santoriello, C., & Zon, L. I. (2012). Hooked! modeling human disease in zebrafish. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 122, Issue 7, pp. 2337–2343). <https://doi.org/10.1172/JCI60434>
- Santos, K. O., Costa-Filho, J., Riet, J., Spagnol, K. L., Nornberg, B. F., Kütter, M. T., ... & Marins, L. F. (2019). Probiotic expressing heterologous phytase improves the immune system and attenuates inflammatory response in zebrafish fed with a diet rich in soybean meal. *Fish & shellfish immunology*, 93, 652-658.
- Schaaf, M. (2017). Nuclear receptor research in zebrafish. *Journal of Molecular Endocrinology*, 59(1), R65–R76.
- Schmidt, K., & Starck, J. M. (2010). Developmental plasticity, modularity, and heterochrony

during the phylotypic stage of the zebra fish, *Danio rerio*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314(2), 166-178.

Schnurr, M. E., Yin, Y., & Scott, G. R. (2014). Temperature during embryonic development has persistent effects on metabolic enzymes in the muscle of zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, 217(8), 1370-1380.

Schröter, C., Herrgen, L., Cardona, A., Brouhard, G. J., Feldman, B., & Oates, A. C. (2008). Dynamics of zebrafish somitogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(3), 545-553.

Shanks, N., Greek, R., & Greek, J. (2009). Are animal models predictive for humans? In *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1747-5341-4-2>

Siccardi III, A. J., Garris, H. W., Jones, W. T., Moseley, D. B., D'Abramo, L. R., & Watts, S. A. (2009). Growth and survival of zebrafish (*Danio rerio*) fed different commercial and laboratory diets. *Zebrafish*, 6(3), 275-280.

Spence, R. (2011). Zebrafish ecology and behaviour. *Zebrafish models in neurobehavioral research*, 1-46.

Spence, R., Ashton, R., & Smith, C. (2007). Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. *Behaviour*, 144(8), 953-966.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2007). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. doi:10.1111/j.1469-185x.2007.00030.x

Sundin, J., Morgan, R., Finnøen, M. H., Dey, A., Sarkar, K., & Jutfelt, F. (2019). On the observation of wild zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*, 16(6), 546-553.

Suurväli, J., Whiteley, A. R., Zheng, Y., Gharbi, K., Leptin, M., & Wiehe, T. (2020). The laboratory domestication of zebrafish: from diverse populations to inbred substrains. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1056-1069.

Trevarrow, B. (2004). Zebrafish Facilities for Small and Large Laboratories. *The Zebrafish: Genetics, Genomics, and Informatics*, 565–591. doi:10.1016/s0091-679x(04)77030-2

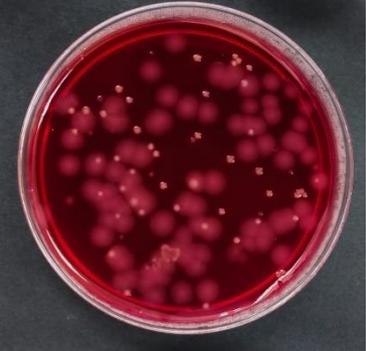
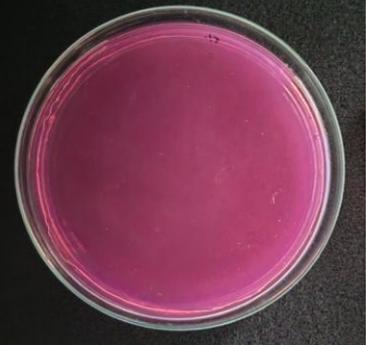
UDLA. (2015). Los límites para usar animales en la Ciencia. Obtenido de: <https://www.udla.edu.ec/2015/02/Los-Limites-Para-Usar-Animales-En-La->

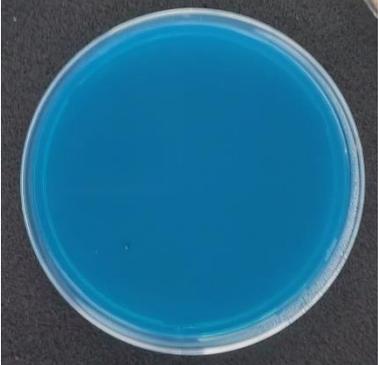
Ciencia/#:~:Text=En%20Ecuador%2C%20la%20experimentaci%C3%B3n%20con,De%20las%20Am%C3%A9ricas%2C%20en%20Quito.

- Uusi-Heikkilä, S., Wolter, C., Meinelt, T., & Arlinghaus, R. (2010). Size-dependent reproductive success of wild zebrafish *Danio rerio* in the laboratory. *Journal of Fish Biology*, 77(3), 552–569. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02698.x>
- Wall, R. J., & Shani, M. (2008). Are animal models as good as we think? *Theriogenology*, 69(1), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.030>
- Watts, S. A., & D'Abramo, L. R. (2021). Standardized reference diets for zebrafish: Addressing nutritional control in experimental methodology. *Annual review of nutrition*, 41(1), 511–527.
- Watts, S. A., Lawrence, C., Powell, M., & D'Abramo, L. R. (2016). The vital relationship between nutrition and health in zebrafish. *Zebrafish*, 13(S1), S-72.
- Wilson, A. J., Réale, D., Clements, M. N., Morrissey, M. M., Postma, E., Walling, C. A., Kruuk, L. E. B., & Nussey, D. H. (2010). An ecologist's guide to the animal model. *Journal of Animal Ecology*, 79(1), 13–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2009.01639.x>
- Winn, AA, Prestia, KA y Peneyra, SM (2021). Prueba de agentes alternativos de desinfección de superficies para embriones de pez cebra (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 60 (5), 510-518.
- Young, T. M., Bray, A. S., Nagpal, R. K., Caudell, D. L., Yadav, H., & Zafar, M. A. (2020). Animal model to study *Klebsiella pneumoniae* gastrointestinal colonization and host-to-host transmission. *Infection and immunity*, 88(11), 10-1128.
- ZIRC. (2022). Zebrafish International Resource Center. Obtenido de <https://zebrafish.org/wiki/protocols/nursery>

ANEXOS

Anexo 1. Medios de Cultivo

Medio de cultivo	Placa de crecimiento	
Agar EMB		
Agar Aeromona Pseudo Selectivo		
Agar Manitol Saldado		
Agar Cetrimida		

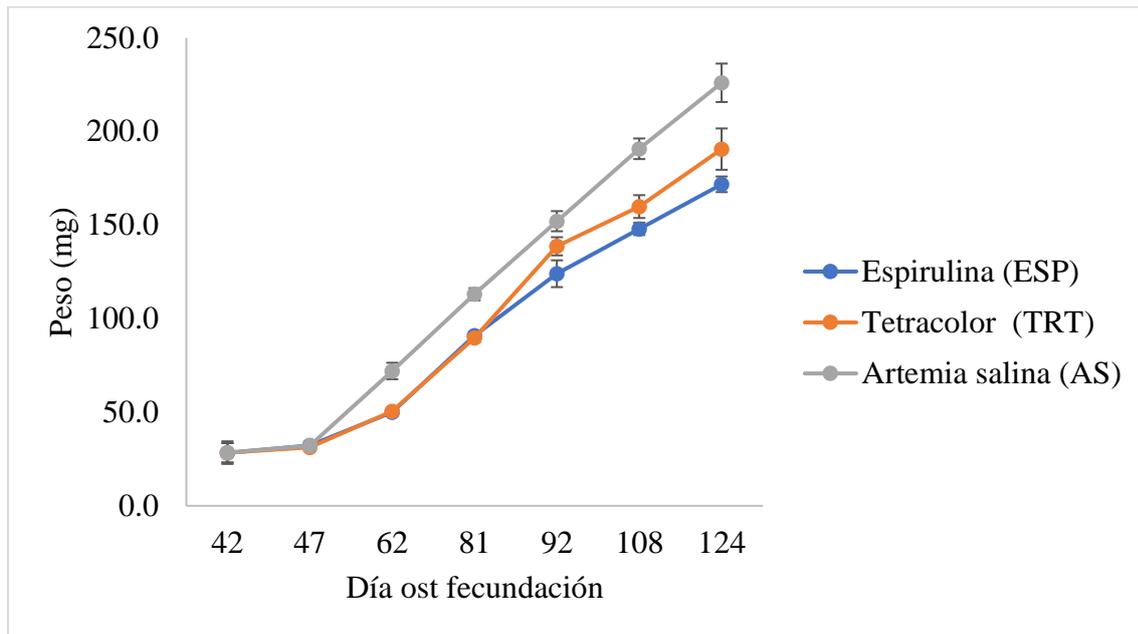
Middlebrook 7h9			
-----------------	--	--	--

Anexo 2. Microorganismos aislados

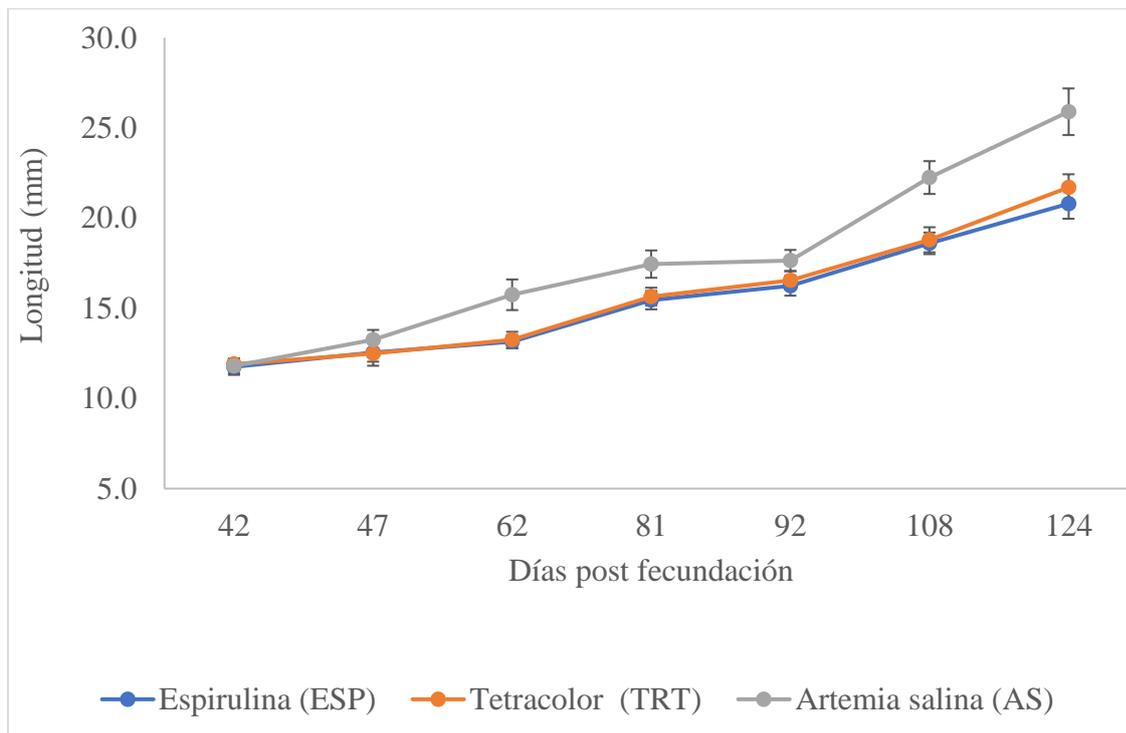
Patógeno	Medio de cultivo	Placa de crecimiento
<i>Enterobacter aerogenes</i>	EMB	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	EMB	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EMB	

<i>Pseudomona aruginosa</i>	Cetrimida			
<i>Pseudomona aruginosa</i>	Agar Aeromona Pseudo Selectivo			
<i>Aeromona hydrophila</i>	Agar Aeromona Pseudo Selectivo			
<i>Salmonella shigella</i>	EMB			

Anexo 3. Registro de datos de peso.



Anexo 4. Registro de datos de longitud.



Anexo 5. Registro promedio semanal de pH durante la alimentación

Semanas	Espirulina (ESP)		Tetracolor (TRT)		Artemia salina (AS)	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Semana 1	7.20	7.17	7.13	7.15	7.19	7.14
Semana 2	7.38	7.48	7.40	7.45	7.49	7.36
Semana 3	7.58	7.53	7.50	7.58	7.59	7.62
Semana 4	7.63	7.67	7.61	7.65	7.68	7.66
Semana 5	7.74	7.68	7.67	7.72	7.79	7.76
Semana 6	7.65	7.76	7.74	7.72	7.80	7.78
Semana 7	8.07	8.12	7.96	7.90	7.79	7.80
Semana 8	7.53	7.79	7.73	7.69	7.73	7.71
Semana 9	7.80	7.65	7.55	7.62	7.47	7.54
Semana 10	7.66	7.62	7.49	7.63	7.58	7.78
Semana 11	7.65	7.67	7.55	7.84	7.65	7.53
Semana 12	7.71	7.72	7.49	7.32	7.69	7.66
Semana 13	7.57	7.57	7.83	7.67	7.57	7.64
Semana 14	7.75	7.60	7.64	7.65	7.62	7.52

Anexo 6. Registro promedio semanal de conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) durante la alimentación

Semanas	Espirulina (ESP)		Tetracolor (TRT)		Artemia salina (AS)	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Semana 1	483.00	494.33	498.00	496.67	507.33	497.33
Semana 2	442.80	456.20	450.20	459.80	450.60	459.60
Semana 3	468.60	477.80	473.40	479.20	474.00	470.20
Semana 4	505.60	498.40	508.40	511.20	509.00	508.20
Semana 5	491.20	506.40	528.00	513.60	505.80	499.00
Semana 6	459.20	456.80	463.40	470.60	456.20	465.80
Semana 7	436.33	439.33	458.67	460.00	537.00	469.00
Semana 8	458.50	442.50	452.75	446.25	520.75	485.75
Semana 9	493.33	510.67	500.00	463.33	522.00	515.67
Semana 10	490.2	494.60	514.40	496.00	508.20	554.60
Semana 11	516.00	532.60	513.40	556.20	561.00	538.40

Semana 12	519.40	513.40	526.20	556.60	531.40	547.60
Semana 13	520.00	535.00	518.60	523.80	510.60	531.00
Semana 14	519.00	471.33	482.67	484.00	467.67	475.00

Anexo 7. Registro promedio semanal de oxígeno disuelto ($\mu\text{S/cm}$) durante la alimentación

Semanas	Espirulina (ESP)		Tetracolor (TRT)		Artemia salina (AS)	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Semana 1	6.90	6.90	6.97	6.80	6.93	6.93
Semana 2	6.94	6.96	6.96	6.88	7.00	6.96
Semana 3	6.92	6.90	7.00	6.88	6.96	6.88
Semana 4	6.70	6.80	6.98	6.90	6.90	6.74
Semana 5	6.96	6.78	6.82	6.88	6.98	6.90
Semana 6	6.86	6.92	6.94	6.76	7.02	6.90
Semana 7	6.70	6.87	6.70	6.73	6.77	6.83
Semana 8	7.00	6.95	6.85	6.85	6.93	6.98
Semana 9	6.80	6.63	6.97	6.87	7.00	6.93
Semana 10	6.9	6.76	7.02	6.92	6.88	6.94
Semana 11	6.90	6.92	7.00	6.88	6.94	6.92
Semana 12	6.94	6.78	7.00	6.92	6.88	6.90
Semana 13	6.82	6.72	6.96	6.86	6.92	6.90
Semana 14	6.73	6.90	6.93	6.90	7.03	6.87

Anexo 8. Composición de alimentos comerciales

Alimento	Composición				
	Proteína (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)
Espirulina Escamas Bug Bites	37	5.5	2	6	5
Peces de Fondo Gránulos Bug Bites Alimento	40	12.5	5	10	9
Bloodworms Tetra	50	2	15	9	-
Tetra Min Plus Tropical Flakes	46	11	3	8	-
Tetra Tropical Color Granulado	47.5	6.5	2	6	-
Tubifex Sera	58.5	8.2	2.9	5.8	5.7
Sera Vipán Nature Hojuelas	46.2	8.9	2.3	6.7	11.9
Artemia Salina (nauplio)	50.5	9.5	15	-	14
Tropical Guppy	50	8	3	7	-

Anexo 9. Crecimiento bacteriano alevines.

Tratamiento	Repetición	Alevín				
		EMB	Agar Aeromona Pseudo Selectivo	Agar Cetrimida	Manitol Salado	Middlebrook 7H9 (modificado)
Espirulina (ESP)	R1	+++	+++	+++	---	---
Espirulina (ESP)	R2	+++	+++	+++	---	---
Tetracolor (TRT)	R1	+++	+++	+++	---	---
Tetracolor (TRT)	R2	+++	+++	+++	---	---
Artemia salina (AS)	R1	+++	+++	+++	---	---
Artemia salina (AS)	R2	+++	+++	+++	---	---

Anexo 10. Crecimiento bacteriano juveniles

Tratamiento	Repetición	Intestino					Bazo					Riñón				
		EM B	Agar Aeromona Pseudo Selectivo	Agar Cetrimida	Manitol Salado	Middlebrook 7H9 (modificado)	EM B	Agar Aeromona Pseudo Selectivo	Agar Cetrimida	Manitol Salado	Middlebrook 7H9 (modificado)	EM B	Agar Aeromona Pseudo Selectivo	Agar Cetrimida	Manitol Salado	Middlebrook 7H9 (modificado)
Espirulina (ESP)	R1	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Espirulina (ESP)	R2	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Tetracolor (TRT)	R1	+++	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Tetracolor (TRT)	R2	+++	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Artemia salina (AS)	R1	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Artemia salina (AS)	R2	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Anexo II. Crecimiento bacteriano adultos.

Tratamiento	Repetición	Intestino					Bazo					Riñón				
		EMB	Agar Aeromona Pseudo Selectivo	Agar Cetrimida	Manitol Salado	Middlebrook 7H9 (modificado)	EMB	Agar Aeromona Pseudo Selectivo	Agar Cetrimida	Manitol Salado	Middlebrook 7H9 (modificado)	EMB	Agar Aeromona Pseudo Selectivo	Agar Cetrimida	Manitol Salado	Middlebrook 7H9 (modificado)
Espirulina (ESP)	R1	++ +	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Espirulina (ESP)	R2	++ +	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Tetracolor (TRT)	R1	++ +	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Tetracolor (TRT)	R2	++ +	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Artemia salina (AS)	R1	++ +	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Artemia salina (AS)	R2	++ +	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Anexo 12. Resumen pruebas bioquímicas

Prueba bioquímica	Bacterias						
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella shigella</i>	<i>E. coli</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Tinción Gram	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	-	-	-	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	-	-
Lactosa	+	+	+	-	-	+	-
TSI	K	K	K	K	K	A	A
Descarboxilación LIA	+	+	+	-	+	+	+
SIM Indol	-	-	-	-	-	+	+
SIM H ₂ S	-	-	-	-	-	-	+
TSI	-	+	-	-	-	+	-
Producción de Gas							
SIM	+	-	-	+	+	-	+
Movilidad							

NOMBRE DEL TRABAJO

Valles.F_Documento Final de Tesis.docx

AUTOR

Fernando Valles

RECUENTO DE PALABRAS

14660 Words

RECUENTO DE CARACTERES

80298 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

74 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

7.8MB

FECHA DE ENTREGA

Jul 25, 2024 2:25 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jul 25, 2024 2:27 PM GMT-5

● 5% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 4% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)