UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

TEMA:

"USO DE BIOMASA DE MICROALGAS COMO ADITIVO ALIMENTICIO PARA EL PEZ CEBRA (*Danio Rerio)"*

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Línea de investigación: Producción industrial y biotecnología sostenible

AUTOR:

Joel Sebastian Andrade Jurado

DIRECTORA:

Ing. Andrea Jazmín Chiliquinga Quispe MSc.

Ibarra – Ecuador 2026

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

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	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Andrade Jurado Joel Sebastian

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Uso de biomasa de microalgas como aditivo alimenticio para el pez cebra (*Danio rerio*)
AUTOR:	Joel Sebastian Andrade Jurado
FECHA:	15/07/2026
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	☒ **PREGRADO** ☐ **POSGRADO**
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniería en Biotecnología
DIRECTOR /ASESOR:	Ing. Andrea Jazmín Chiliquinga Q. MSc./Ing. Carla Sandoval 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 la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 15 días del mes de julio de 2026

EL AUTOR:

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
JOEL SEBASTIAN ANDRADE JURADO

Joel Sebastian Andrade Jurado

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, 15 de julio de 2026

Ing. Andrea Jazmín Chiliquinga Q. 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.



Ing. Andrea Jazmín Chiliquinga Q. Msc.

C.C.: 1720064193

APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificador del trabajo de Integración Curricular "USO DE BIOMASA DE MICROALGAS COMO ADITIVO ALIMENTICIO PARA EL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)" elaborado por Joel Sebastian Andrade Jurado, previo a la obtención del título del Ingeniero en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
ANDREA JAZMIN CHILIQUINGA QUISPE

Ing. Andrea Jazmin Chiliquinga Q. MSc.

C.C.:1720064193

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
CARLA ALEXANDRA SANDOVAL GUANO

Ing. Carla Sandoval MSc.

C.C.:1718017294

PRESENTACIÓN

Yo, ANDRADE JURADO JOEL SEBASTIAN, con el número de identidad C.C: 1003839089 en calidad de autor de la tesis titulada "USO DE BIOMASA DE MICROALGAS COMO ADITIVO ALIMENTICIO PARA EL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)", me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a las personas que me apoyaron y creyeron en mi en todo momento; a mi familia, mi padre que siempre estuvo presente y no dejó que me falte nada durante mis estudios; a mi madre, quien fue testigo de todos los momentos difíciles, decepciones y obstáculos a lo largo de la carrera y que con su apoyo y escucha me ayudó a superar y seguir adelante; a mi hermano que con los ratos de ocio me ayudó a despejarme y aclarar mis ideas.

A mis amigos en el laboratorio, Mateo, Aarón, Nayeli y Eve cuya ayuda, consejos y bromas hicieron la convivencia algo memorable; a mi pareja Yuly, quien me ayudó incluso en ocasiones en las cuales yo no me sentía capaz y creyó en mi para lograrlo. A mi mejor amigo Saith, quien, aunque tenía sus propios problemas, estuvo allí para ayudarme y escucharme si lo necesitaba.

A mis profesores y profesoras a lo largo de toda la carrera, quienes me demostraron que aún existen personas con la capacidad de fomentar el ansia de aprender y dejar una huella que no se borrará. Nunca dejen de ser tan entregados a la enseñanza y continúen cambiando la mente de más jóvenes.

RESUMEN EJECUTIVO

En la actualidad, se estima el aumento de la acuicultura en un 1.2 % anual hasta el año 2030, esto incrementando la demanda de ingredientes con alto valor nutricional para la fabricación de piensos. Debido a que gran parte de alimentos comerciales emplean fuentes de alimento provenientes de la pesca silvestre, esto se vuelve contraproducente para el medio ambiente y abre camino a investigaciones donde se buscan posibles ingredientes alternativos como nuevas fuentes de macronutrientes esenciales. En el presente estudio, se buscó formular dos dietas experimentales: una dieta con 0 % de inclusión de biomasa de microalga y otra con 10 % de inclusión, evaluando su efecto fisiológico en peces cebra (*Danio rerio*) adultos divididos por sexo. El periodo de evaluación duró 30 días y se tomó como principales variables de respuesta la variación en longitud, masa corporal, tasa específica de crecimiento (SGR), factor de conversión alimenticia (FCR) e índice K. Para esto se hizo un análisis de la varianza con transformación alineada por rangos para determinar significancia en factores de estudio y su interacción; para las variables SGR Y FCR no se evidenció significancia estadística, sin embargo, en cuanto a la variación en longitud y masa corporal se encontró que el sexo es un factor determinante ya que los machos ganaban mayor masa que las hembras y estas no indicaron valores negativos para longitud en cuanto a los resultados obtenidos con la dieta de 0 % de biomasa de microalga a diferencia de los machos, además, los valores del índice K obtenidos a lo largo de la evaluación se mantuvieron mayormente dentro de rangos establecidos. No se puede concluir que alguna de las dietas evaluadas sea mejor, atribuyendo este resultado a la edad de los ejemplares y solamente se llega a inferir que las dietas pueden ser empleadas en el mantenimiento de especímenes de la misma edad.

Palabras clave: microalga**,** *Danio rerio,* nutrición acuícola

ABSTRACT

Aquaculture is estimated to increase by 1.2% per year until 2030, increasing the demand for ingredients with high nutritional value for feed manufacturing. Because much commercial food uses food sources from wild fisheries, this becomes counterproductive for the environment and opens the way to research where possible alternative ingredients are sought as new sources of essential macronutrients. In the present study, we sought to formulate two experimental diets: one with 0% inclusion of microalgae biomass and another with 10% inclusion, to evaluate their physiological effect on adult zebrafish (Danio rerio) divided by sex. The evaluation period lasted 30 days, and the main response variables were variation in length, body mass, specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR), and K-index. For this, an analysis of variance was made with range-aligned transformation to determine significance in study factors and their interaction; for the SGR and FCR variables, no statistical significance was evidenced. However, in terms of variation in length and body mass, sex was found to be a determining factor, since males gained greater mass than females and females did not indicate negative values for length in the results obtained with the diet of 0% microalgae biomass, unlike males. In addition, the K index values obtained throughout the evaluation remained mostly within established ranges. It cannot be concluded that any of the diets evaluated are better, attributing this result to the age of the specimens, and it is only inferred that the diets can be used in the maintenance of specimens of the same age.

Keywords: microalgae**,** *Danio rerio,* aquaculture nutrition

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I 1

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Problema 1

1.2. Antecedentes 1

1.3. Justificación 2

1.4. Objetivos 3

1.4.1. General 3

1.4.2. Específicos 3

1.5. Hipótesis 3

CAPÍTULO II 3

2. MARCO TEÓRICO 3

2.1. Pez cebra (Danio rerio) 3

2.1.1. Generalidades 4

2.1.2. Condiciones de cultivo 4

2.1.3. Pez cebra como modelo animal 5

2.1.4. Alimentación 6

2.1.5. Aditivos alimenticios 7

2.1.6. Evaluación de crecimiento y eficiencia alimentaria 8

2.2. Microalgas 9

2.2.1. Generalidades 9

2.2.2. Aspectos morfológicos 9

2.2.3. Clasificación 10

2.2.4. Microalgas como aditivo alimenticio 12

CAPÍTULO III 14

3. MARCO METODOLÓGICO 14

3.1. Formulado de las dietas experimentales 14

3.1.1. Uso de la herramienta Solver 15

3.1.2. Proceso de peletización 17
3.1.3. Ensayo de Bradford para cuantificación de proteínas 18
3.1.4. Ensayo de Fenol-sulfúrico (Dubois) par cuantificación de carbohidratos totales. 20
3.1.5. Cuantificación de grasa mediante Soxhlet 21
3.2. Manejo del modelo animal y suministración de la dieta 22
3.3. Pesaje y medición longitudinal de los peces 23
CAPÍTULO IV 24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 24
4.1. Formulado de las dietas experimentales 24
4.1.1. Cuantificación de proteínas 26
4.1.2. Cuantificación de grasas 27
4.1.3. Cuantificación de carbohidratos 28
4.2. Manejo del modelo animal 29
4.3. Pesaje y medición de especímenes 32
4.4. Análisis de índices de crecimiento 34
4.4.1. Eficiencia nutricional 34
4.4.2. Crecimiento somático 35
4.4.3. Condición fisiológica 37
CAPÍTULO V 39
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 39
5.1. Conclusiones 39
5.2. Recomendaciones 41
CAPÍTULO VI 41
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 41

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 *PARÁMETROS EN EL CULTIVO DE D.RERIO* 4
TABLA 2 *COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE MICROALGAS* 9

Tabla 3 *Composición nutricional de especies de microalgas (% de peso seco)* 13

Tabla 4 *Aporte nutricional de posibles ingredientes para la formulación de dieta* 14

Tabla 5 *Valores mínimos y máximos de macronutrientes en dieta* 15

Tabla 6 *Restricciones establecidas en la herramienta Solver* 16

Tabla 7 *Composición de mix de vitaminas comercial en 112 g* 16

Tabla 8 *Composición de mix de minerales en 25 mL* 17

Tabla 9 *Metodologías empleadas para análisis bromatológico* 18

Tabla 10 *Preparación de 300 mL solución de buffer PBS 25 nM* 19

Tabla 11 *Reactivos para preparación de 500 mL de reactivo de Bradford* 19

Tabla 12 *Porcentaje de ingredientes presentes en dieta A y B* 24

Tabla 13 *Dietas experimentales formuladas y control* 26

Tabla 14 *Resultados del ANOVA ART para el porcentaje de variación de masa y longitud* 33

Tabla 15 *Resultados del ANOVA ART para la variable FCR* 35

Tabla 16 *Resultados del ANOVA ART para la variable SGR* 36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 *Curva de calibración con BSA* 26

Figura 2 *Curva de calibración con glucosa anhidra* 28

Figura 3 *Monitoreo de parámetros durante el periodo de experimentación* 30

Figura 4 *Variación porcentual de masa y longitud al final de la experimentación* 33

Figura 5 *Gramos de alimento necesarios para producir un gramo de biomasa por tratamiento* 35

Figura 6 *Porcentaje de ganancia de masa por día para cada tratamiento* 36

Figura 7 *Variación en el valor K durante la suministración de la dieta* 38

CAPÍTULO I

1. Introducción

1.1. *Problema*

Desde la década de los 90, el cultivo de especies acuáticas se ha triplicado llegando a una estimación del aumento de 1,2 % anual hasta el año 2030, lo cual ha incrementado la demanda de piensos para peces. Los principales ingredientes en los piensos formulados para la acuicultura son la harina y aceite de pescado ya que proveen de nutrientes, proteínas y ácidos grasos esenciales para la supervivencia. Paralelamente, la actividad pesquera ha disminuido un 31% entre los años 2000 y 2017 debido a que las industrias optan por la piscifactoría en lugar de la pesca silvestre, esto provoca escasez de peces forrajeros, principal fuente de harina y aceite de pescado (Naylor et al., 2021). A pesar de que, en la actualidad, el porcentaje de harina de pescado empleado en alimento ha disminuido un 9 % en el periodo de 2005 a 2015, aun se evidencia una gran dependencia en el mercado acuicultor en cuestiones de peso neto, esto, acompañado del aumento de la actividad acuicultora, puede generar afectaciones a los ecosistemas marinos a largo plazo (Nagappan et al., 2021; Zlaugotne et al., 2022; Marcillo, 2017; Ghamkhar & Hicks, 2020; Changing Markets Foundation & Compassion in World Farming, 2019)).

Por otra parte, pese a que se ha evidenciado que las microalgas tienen un buen aporte nutricional para la dieta de los peces cultivados, su biodisponibilidad se ve limitada debido a que muchas de las especies presentan una pared celular conformada por peptidoglicanos o azúcares complejos como la celulosa, lo que la vuelve rígida e indigerible para los peces; además, se tiene constancia de que varias microalgas pueden secretar inhibidores enzimáticos que impiden la degradación de compuestos complejos (Annamalai et al., 2021).

1.2. *Antecedentes*

La acuicultura se ha convertido en una de las principales fuentes de pescado y mariscos desde los últimos 20 años. En 2017, cerca de 425 especies fueron producidas a partir de esta técnica, entre ellas, peces de agua dulce, moluscos, algas marinas y crustáceos. La acuicultura presenta importante repercusión a niveles investigativos, siendo la principal fuente de organismos con la capacidad de ser estudiados y empleados a nivel de laboratorio como organismos modelo (Naylor et al., 2021). Dentro de las especies empleadas para estudio, se puede destacar a *Danio rerio* como esencial por sus diversas características: la estructura de su genoma comparte cerca del 70 % de similitud con los humanos; disponibilidad de cientos de embriones en un solo proceso de reproducción; y sus mecanismos inmunológicos similares al ser humano (Choi et al., 2021).

A pesar de la trayectoria y desarrollo de la acuicultura, la estandarización de procesos para la alimentación de los peces requiere la atención de los investigadores, en especial porque la mayoría de los alimentos no son sustentables a largo plazo, bien sea por impactos ambientales o costos de producción; la solución es encontrar nuevas formas de nutrir los cultivos. Actualmente, emplear biomasa de microalgas como aditivo alimentario es un tema de interés para el sector acuícola; según Annamalai et al., (2021) las microalgas tienen futuro en el campo acuícola por tener una combinación adecuada de nutrientes requeridos por los peces. Sin embargo, señala que la digestibilidad es un factor por tomar en cuenta en la formulación de un alimento ideal.

Ahmad et al., (2022) menciona que en la actualidad se emplea una combinación de dos especies de microalgas, *Nannochloropsis oculata*, y *Schizochytrium sp*, para la alimentación de la tilapia del Nilo. Además, el consumo de microalgas genera probióticos para el microbiota del pez, esto se evidenció en la reducción de bacterias perjudiciales en el estómago del camarón blanco luego de consumir *Tetraselmis suecica.*

1.3. *Justificación*

Las microalgas se presentan como un potencial recurso ante la necesidad de encontrar nuevas fuentes de alimento capaces de proporcionar los nutrientes necesarios para la acuicultura debido a su amplia variedad de especies y composiciones, lo que permite que haya microalgas que estén más adaptadas a las necesidades de alimentación que la especie requiera. Además, el uso de biomasa como aditivo alimentario tiene como ventajas el ser un producto proveniente de un organismo autótrofo capaz de emplear la luz solar como fuente de energía y no depender de una fuente de carbono orgánico, en adición, son organismos versátiles que crecen en ambientes diversos y esto lo vuelve una opción ambiental y económicamente sostenible (Pei En Tham et al., 2023).

1.4. *Objetivos*

1.4.1. General

Emplear biomasa de microalgas como aditivo alimentario para el pez cebra (*Danio rerio).*

1.4.2. Específicos

- Formular un alimento balanceado utilizando biomasa de microalga como aditivo nutricional.
- Evaluar fisiológicamente el efecto del balanceado en ejemplares adultos hembras y machos de la especie *Danio rerio.*

1.5. *Hipótesis*

La biomasa obtenida a partir de microalgas es un aditivo ideal que aporta los nutrientes esenciales para la supervivencia de la especie *Danio rerio.*

CAPÍTULO II

2. Marco teórico

2.1. *Pez cebra (Danio rerio)*

2.1.1. Generalidades

El pez cebra, es un animal omnívoro de agua dulce, ubicado naturalmente en el sur de Asia en aguas tropicales. Esta especie presenta dimorfismos sexuales, características que permiten diferenciar entre macho y hembra, tales como el hecho de que las hembras son ligeramente redondeadas, y los machos presentan una leve coloración anaranjada en la aleta anal, mientras que las hembras tienen una coloración amarilla. Su reproducción es fácil de inducir en laboratorio y no requiere de épocas específicas, además de producir cientos de especímenes en un solo desove, sin embargo, el posible consumo de sus crías ha promovido el desarrollo de tanques especiales para este propósito. Llegan a su estado larvario a las 72 horas tras desove y alcanzan un estado juvenil a los 30 días (Esmail et al., 2015; University of Oregon, 2019).

2.1.2. Condiciones de cultivo

A pesar de que los peces cebra son considerados una especie de fácil mantenimiento, se deben establecer las condiciones óptimas para mantener los parámetros con la menor variación posible. En la Tabla 1 se establecen ciertas condiciones y recomendaciones para el mantenimiento de peces cebra (Texas Tech University, 2024; Aleström et al., 2019).

Tabla 1

Parámetros en el cultivo de D.rerio

Parámetro	Recomendación
Temperatura	• Para embriones: 28,5 a 29 °C • Para las etapas desde larvas a adultos: 24 a 29 °C
Fotoperiodo	Aceptable al estar en periodos de 12 y 14 h luz
Calidad del agua	• Nulos niveles de cloro • Amoniaco < 0,1 mg/L • Nitratos < 0,3 mg/L • Nitratos < 25 mg/L • pH*: 6,5 - 8 • Conductividad*: 150 - 1700 µS/cm • Dureza general: 50 – 100 mg/L • Salinidad: 0,5 – 2 g/L • Oxígeno disuelto*: > 5 mg/L
Densidad poblacional	• 1 - 5 peces adultos por litro • 40 - 50 larvas por litro • 100 embriones por cada 35 mL

Nota. los asteriscos (*) indican aquellos parámetros que deben ser medidos diariamente

2.1.3. Pez cebra como modelo animal

El primer estudio contundente con *D. rerio* fue desarrollado por George Streisinger en la década de 1860, con una investigación sobre el sistema nervioso, pero no fue hasta 1980 que este organismo captó la atención de la comunidad científica al poderse producir clones de pez cebra; desde entonces se ha empleado a *D. rerio* como modelo animal por su facilidad de manejo en laboratorio, comparte mecanismos inmunológicos con el ser humano, cerca del 70 % de genes de proteínas humanas son ortólogos a los genes del pez cebra, se desarrolla de forma ex útero, corto ciclo de vida, alta fecundidad, formación de tejidos complejos y la transparencia de sus embriones, lo cual lo vuelve idóneo para estudios en donde se evalúe influencia del entorno en el desarrollo

embrionario; la fisiología de células cancerosas, la regeneración del tejido, toxicología e ingeniería genética (Vimalraj et al., 2021; Krone et al., 2003).

2.1.4. Alimentación

Este es un factor que influye directamente en el bienestar de cualquier especie animal; en bioterios donde se emplean animales para fines investigativos, su alimentación se encuentra estandarizada tomando en cuenta la masa corporal y los requerimientos nutricionales. En el caso del pez cebra, es incierto un protocolo estandarizado de alimentación ya que usualmente se emplean dietas formuladas para otras especies que comparten similaridad. La alimentación es determinante en el desarrollo de estudios con el pez cebra ya que es una variable que puede influir en gran medida en los datos obtenidos durante una investigación, volviéndolos menos replicables. A pesar de haber variabilidad en las dietas presentes en estudios, los valores en porcentaje de proteínas y grasas se mantienen estables, con un promedio de 45 y 10 % respectivamente, de igual manera sucede con la energía bruta aportada, que normalmente es de 20,4 KJ/g. Los niveles de carbohidrato son variables, pero su inclusión en la dieta es fundamental si se busca una mayor retención de la proteína asimilada, buena tasa de crecimiento y un mejor aprovechamiento de la energía, ya que a pesar de que los peces usen principalmente los lípidos como fuente de energía, es necesaria la presencia de azúcares que eviten el uso de otros macroelementos para la producción de glucosa. Entre los macrominerales esenciales para el desarrollo del pez, se encuentran el magnesio, cofactor en reacciones enzimáticas; calcio, esencial para el desarrollo de huesos y fósforo, componente presente en ácidos nucleicos. Además de estos, también se menciona la presencia de otros compuestos en cantidades traza, como cobre, por ser cofactor enzimático; el hierro, para el transporte de oxígeno y reacciones redox; potasio, para evitar convulsiones y

anorexia; por último, manganeso, zinc y selenio que se agrega para la homeostasis del pez (Fowler et al., 2020; Watts et al., 2012).

El alimento se suministra de 2 a 5 veces por día en adultos dependiendo del investigador, siendo de dos formas, *ad libitum* (por saciedad) y mediante cálculos con la masa, sin embargo, la mayoría de los estudios utilizan la segunda forma porque reduce la cantidad de comida desperdiciada, es menos costosa, promueve la salud del pez y no incrementa los niveles de amoniaco, que es un agente contraproducente en el ecosistema del pez; para este tipo de suministración, es necesario un monitoreo constante del masa del espécimen; en los primeros meses de vida se suministra el 7 % de su masa corporal en alimento y este porcentaje disminuye a lo largo de las etapas de desarrollo, con un 5 % en los meses 3 y 4 y llegando hasta el 3 % desde los 5 meses en adelante (Licitra et al., 2024; Fowler et al., 2020).

2.1.5. Aditivos alimenticios

- **Antioxidantes**

Debido a que los lípidos presentes en la dieta son fácilmente oxidables, es necesario administrar compuestos antioxidantes como la vitamina E, vitamina C y pigmentos que controlen la producción de ROS (especies reactivas el oxígeno). Estos deben cumplir con ciertos requisitos para ser empleados: no tener efectos adversos en la dieta, ser efectivos en bajas concentraciones y no aumentar excesivamente el costo de producción. La etoxiquina es un antioxidante empleado en la industria alimenticia, comprobado como eficaz en dosis de 25 a 50 mg/kg (Vasileios et al., 2022).

- **Inmunoestimulantes**

Son compuestos con la capacidad de activar la inmunidad primaria (no específica) para mejorar el sistema inmunológico contra amenazas patogénicas. Los β-glucanos, quitosano y

rafinosa pertenecen a esta categoría, siendo usados para promover la actividad fagocítica, producción de lisozimas y aumentando la producción de leucocitos en la especie C*yprinus rubrofuscus;* de igual forma sucede en la especie *D. rerio* donde se péptidos antimicrobianos promueven la expresión de genes que codifican para receptores tipo toll 1 y 2, además de influir directamente en la membrana de las bacterias para provocar lisis celular (Vijayaram et al., 2022).

2.1.6. Evaluación de crecimiento y eficiencia alimentaria

Los índices de alimentación son necesarios durante una investigación para poder estandarizar tratamientos y asegurar la reproducibilidad de los resultados; los más empleados en investigaciones son: la cantidad de alimento suministrado (Feed Intake, FI), que indica cuánto alimento fue consumido por cada pez en un periodo de tiempo específico; el factor de conversión alimenticia (Feed Convertion Ratio, FCR), que relaciona la cantidad de alimento suministrada con la ganancia neta de masa corporal para cada pez y valores bajos indican mayor eficiencia; la tasa específica de crecimiento (Specific Growth Rate, SGR), que expresa la ganancia de masa en porcentaje por día; el factor de condición K o índice de Fulton, que relaciona la longitud y masa para dar como resultado la condición del ejemplar, haciendo referencia si este presenta o no buena condición morfológica, en ocasiones se establecen rangos al igual que con el índice de masa corporal en humanos, sin embargo, esto no es aplicable a todas las especies sino mayormente a aquellas de interés para la acuicultura; la tasa de supervivencia, con la cual se puede determinar si las dietas experimentales tienen efecto tóxico para los organismos o generan cambios en el funcionamiento adecuado del organismo; el porcentaje de masa ganada y el porcentaje de longitud ganada. Estos índices permiten evaluar el efecto de una dieta experimental sobre el rendimiento y bienestar del pez cebra. Sin embargo, la cuantificación precisa de alimento ingerido sigue presentado un reto por el tamaño reducido de esta especie en particular, a pesar de ello, la inclusión

de marcadores de fluorescencia y el uso de tecnologías por imágenes han aumentado la precisión en la toma de datos (Licitra et al., 2024; Jia et al., 2024; Mtaki et al., 2021).

2.2. *Microalgas*

2.2.1. Generalidades

Las microalgas son un grupo de microorganismos, tanto procariotas como eucariotas, con la capacidad de vivir en ecosistemas acuáticos de agua dulce y salada; además, son seres autótrofos fotosintéticos facultativos que integran la energía de la luz solar en sus procesos metabólicos para la producción de metabolitos secundarios y biomasa, con la posibilidad de ser heterotróficos en aquellas ocasiones en las que la cantidad de luz es escasa (Dolganyuk et al., 2020).

2.2.2. Aspectos morfológicos

Los aspectos morfológicos como su estructura, tamaño, forma y conformación determinan las cualidades de un género o especie determinado. Estos microorganismos pueden medir desde 0,5 a 200 µm, debido a la amplia variedad en géneros, especies y etapas de crecimiento. Por otra parte, es posible que se presenten como células aisladas o conformando agregados en matriz mucilaginosa y pueden tener una forma definida (cenobios) o ser amorfas. Además, la estructura de la pared celular es un factor bastante variable entre los filos existentes, siendo diferentes en composición, presencia o ausencia, en la Tabla 2 se resume la composición de las paredes celulares de los filos más representativos de las microalgas.

Tabla 2

Composición de la pared celular de los principales grupos de microalgas

Filo	Pared celular
Cyanobacteria	Conformada por un complejo de peptidoglicano-polisacárido
Chlorophyta	Paredes de polisacárido celulósicos y no celulósicos

Euglenophyta	No presenta pared celular, únicamente una película
Haptophyta	Pared ausente, formada por celulosa similar a escamas o compuesta por carbonato de calcio
Rhodophyta	Presenta dos capas: interna de celulosa y externa mucilaginosa
Dinophyceae	Formada por celulosa en forma de escamas
Eustigmatophyceae	Paredes de polisacáridos

2.2.3. Clasificación

Dado a que las microalgas presentan una amplia diversidad en pigmentos producidos, composición de la pared celular, estructura y diferencias entre organelos (tilacoides y cloroplastos), su clasificación no se encuentra bien definida; por lo tanto, se considera importante hablar de 7 grupos principales detallados por Jacob-Lopes et al. (2020, pp. 31–36).

2.2.3.1. Cyanobacteria (Procariota)

Son organismos unicelulares de estructura procariota, específicamente gram negativas sin motilidad, con la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, razón por la cual se les considera los organismos encargados de oxigenar la Tierra en la era Proterozoica. El subgrupo Cyanobacteria abarca 150 géneros y aproximadamente 8000 especies, como Arthrospira y Nostoc. Es posible encontrarla en lagos, océanos, ríos, suelos y árboles, aportando de manera significativa en la fijación de nitrógeno y carbono. Son capaces de secretar metabolitos promotores de crecimiento en plantas, además de reducir la cantidad de CO_2 en ambiente y solubilizar el fosfato (Nawaz et al., 2024).

2.2.3.2. Chlorophyta

Es un grupo de algas verdes de agua dulce productores de pigmentos como la luteína, el caroteno, xantofilas y clorofilas a y b. Entre sus especies más representativas están Dunaliella *salina, Chlamydomonas reinhardtii*, *Haematococcus pluvialis y Chlorella sp*; la última es una de las especies más estudiadas, tanto en agricultura, acuicultura y medicina por sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antibacteriana y su alto valor nutricional (Ibrahim et al., 2023).

2.2.3.3. Euglenophyta

Se definen como organismos unicelulares caracterizados por su motilidad y que la mayoría de este grupo son organismos heterotróficos por la falta de cloroplastos. Aquellos organismos autotróficos tienen como carbohidrato de reserva al paramilo, además de que los pigmentos que producen son similares a los de las Chlorophytas, Su mayor representante es el género *Euglena*, una fábrica de metabolitos de interés (Jacob-Lopes, 2020).

2.2.3.4. Haptophyta

Mayormente organismos móviles unicelulares con un organelo asociado a los flagelos, el haptonema, tienen forma de cocos o agrupaciones palmeloides; su coloración café amarillenta viene dada por los pigmentos clorofila a, c_1 y c_2 además de xantofilas y carotenoides. Se encuentran mayormente en ecosistemas de agua salada, conformando gran parte del fitoplancton marino; en adición, producen dimetilsulfuro que contribuye a la condensación de nubes y a su vez, al cambio climático de una zona (Jacob-Lopes, 2020; Sheath & Wehr, 2003).

2.2.3.5. Rhodophyta

Son algas rojas que tienen ficobiliproteínas como pigmentos, lo que le brinda su color. Su principal fuente de reserva de carbohidratos es una azúcar denominada almidón de Florida. Se encuentran en mares, su morfología es esférica y pueden formar agregados asilados en matrices mucilaginosas. Cerca de 7000 especies integran este filo, y son de interés de la investigación por ser productores de ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y pigmentos (Jacob-Lopes, 2020).

2.2.3.6. Dinophyceae

Son organismos biflagelados unicelulares que se encuentran principalmente en aguas saladas, presentan una coloración dorada, la cual está dada por la peridinina, un pigmento carotenoide, además de que también presentan clorofila a y c_2. Únicamente el 50 % de las especies

pertenecientes a este medio son autotróficas, el resto forman simbiosis con corales para su supervivencia. En la actualidad se han evaluado las biotoxinas que producen para dar un potencial farmacológico (Wynn et al., 2010).

2.2.3.7. Eustigmatophyceae

Lo conforman aproximadamente 30 especies, las cuales son organismos unicelulares esféricos, ovalados, en forma de cocos o sin una estructura definida, que se presentan de manera aislada en agua dulce, a excepción del género *Nannochloropsis,* el cual se encuentra solo en agua salada y es el principal género estudiado por su aplicabilidad en biocombustibles, composición en ácidos grasos poliinsaturados y pigmentos (clorofila a y violaxantina) (Salmaso & Tolotti, 2009).

2.2.4. Microalgas como aditivo alimenticio

La problemática que acarrea el uso de productos provenientes de la pesca silvestre para la propia elaboración de alimento para la acuicultura ha desencadenado el uso de fuentes alternativas para poder suplir la demanda de nutrientes para los cultivos. Bajo este concepto es que se plantea a la biomasa de microalga, por su contenido en proteína y su perfil de aminoácidos completo, suplantando a la proteína aportada por la harina de pescado y productos vegetales. En las últimas 3 décadas se ha evaluado la posibilidad de implementar esta opción, con estudios que analizan la digestibilidad aparente, costos de producción y posibles efectos adversos, esto ha llevado a la conclusión de que la variedad de condiciones a las que pueden sobrevivir y las múltiples especies presentes en cada subgrupo, permiten generar un abanico extenso de opciones, sin mencionar que es posible acoplar tanto el cultivo de peces como el de microalgas para volverlo más sustentable (Ansari et al., 2021). Entre las microalgas más estudiadas se encuentran las del género *Chlorella* y *Spirulina,* además de otras posibles opciones que se detallan en la Tabla 3 por su composición nutricional (Gao et al., 2024).

Tabla 3

Composición nutricional de especies de microalgas (% de peso seco)

Microalga	**Proteína**	**Carbohidrato**	**Lípidos**
Anabaena cylindrica	43–56	25–30	4–7
Aphanizomenon flos-aquae	62	23	3
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21
Chlorella vulgaris	51–58	12–17	14–22
Chlorella pyrenoidosa	57	26	2
Dunaliella salina	57	32	6
Euglena gracilis	39–61	14–18	14–20
Scenedesmus obliquus	50–56	10–17	12–14
Spirulina maxima	60–71	13–16	6–7
Spirulina platensis	46–63	8–14	4–9
Synechococcus sp.	63	15	11

Nota. Extraída de (Gao et al., 2024).

La digestibilidad de estos nutrientes es esencial para determinar que el alimento es adecuado para la dieta del pez, en estudios se ha determinado que es necesario analizar el porcentaje de harina de pescado que puede ser reemplazada ya que se evidencia una respuesta contraproducente en concentraciones elevadas, afectado principalmente a la ingesta de alimento y el crecimiento del pez; los factores que contribuyen a esta respuesta son la menor cantidad de minerales (ceniza) en el alimento, la disminución en la palatabilidad y el aumento en agentes antinutricionales como carbohidratos no asimilables, los cuales también se encuentran en microalgas (Ansari et al., 2021).

Otro de los factores a tomar en cuenta al momento de emplear una microalga como suplemento alimenticio, es su aplicación dentro de la dieta: microalga viva, que, al encontrarse en

este estado, tiene todos sus compuestos intactos, lo cual no implica una pérdida en procesos post-cosecha, sin embargo, el mantenimiento de dichas células, la continua producción a alta escala y la digestibilidad son problemas evidentes; células completas, que ya no es necesario mantener su viabilidad sino solamente evitar su degradación durante el almacenamiento, aunque presenta el mismo problema que la biomasa viva, baja digestibilidad; células "rotas", empleando métodos de ruptura mecánica y degradación enzimática para promover el aprovechamiento de nutrientes y mejorar su asimilación durante la digestión (Bongiorno et al., 2022); y extractos de microalga, es una técnica empleada para extraer únicamente los ácidos grasos de interés para la dieta del pez, y poder suplir tanto al aceite de pescado como los aceites provenientes de fuentes vegetales (Santigosa et al., 2021).

CAPÍTULO III

3. Marco metodológico

3.1. *Formulado de las dietas experimentales*

Se buscó formular dos dietas: A, dieta base sin presencia de biomasa de microalga y B, con biomasa; para ello, se tomaron los ingredientes presentes en la Tabla 4 y de ellos, los que mejor se consideraron para proporcionar los macronutrientes esenciales (proteínas, carbohidratos y lípidos), fueron el aceite de canola (AC), harina de arveja (HA) y harina de pescado (HP).

Tabla 4

Aporte nutricional de posibles ingredientes para la formulación de dieta

Ingredientes	Grasa total (%)	Carbohidratos (%)	Proteína (%)
Aceite de canola (AC)	100	0	0
Harina de haba (HH)	2	63	21
Harina de arveja (HA)	0	66.67	20

Harina de plátano maicena y soya (HPMS)	1.67	76.67	6.67
Harina de plátano y soya (HPS)	3.33	25	3.33
Harina de maíz (HM)	0.50	76.67	6.67
Harina de pescado (HP)	7	5	45

3.1.1. Uso de la herramienta Solver

Para determinar las cantidades necesarias de AC, HA y HP para cada dieta, primero se establecieron rangos estándar obtenidos de los estudios de Carneiro et al. (2020), Rasool et al. (2018), Licitra et al. (2024) y O'Brine et al. (2015); dichos rangos se encuentran evidenciados en la Tabla 5.

Tabla 5

Valores mínimos y máximos de macronutrientes en dieta

Límites	**Lípidos (%)**	**Carbohidratos (%)**	**Proteína (%)**
Valor min.	4.51	20.00	25.00
Valor máx.	15.31	40.00	32.00

Tras establecer los rangos, se empleó el complemento Solver del software estadístico Excel, como se realiza en las investigaciones de Rapatsa y Moyo (2022) y Odhiambo et al. (2022) para formular la dieta base mediante programación lineal, empleando el método de resolución Simplex LP sin modificaciones, las variables correspondieron a los porcentajes de inclusión de los ingredientes para cada dieta y las restricciones se hicieron en base a los rangos de lípidos, carbohidratos y proteína establecidos con anterioridad, buscando que la sumatoria de estos no supere ni sea inferior a los valores planteados. En la Tabla 6 se muestra una representación de las restricciones empleadas.

Tabla 6

Restricciones establecidas en la herramienta Solver

Restricción	Interpretación
∑ %lípidos ≥ Val. Mínimo ∑ %lípidos ≤ Val. Máximo	El % de lípidos de la dieta debe estar entre 4.51 y 15.31
∑ %proteínas ≥ Val. Mínimo ∑ %proteínas ≤ Val. Máximo	El % de proteínas de la dieta debe estar entre 25 y 32
∑ %carbohidratos ≥ Val. Mínimo ∑ %carbohidratos ≤ Val. Máximo	El % de carbohidratos de la dieta debe estar entre 20 y 40

Nota. para las restricciones, es necesario comparar netamente los valores de una celda con los de otra.

Para la adición de microalga en la dieta B, la biomasa fue pretratada mediante molienda, obteniendo un polvillo fino para favorecer su digestibilidad. Esta dieta se obtuvo a partir del reemplazo de parte de la harina de pescado para llegar a un porcentaje de inclusión del 10% de biomasa en dieta (Annamalai et al. 2021; Carneiro et al. 2020; Tibbetts et al. 2017).

Finalmente, las dietas A y B fueron suplementadas con 3.5g/kg de dieta del mix de vitaminas y 25 mL/kg de dieta del mix de minerales; la composición de estas formulaciones se encuentra en la Tabla 7 y 8 (Carneiro et al. 2020; Schneider et al., 2014).

Tabla 7

Composición de mix de vitaminas comercial en 112 g

Componente	IU	Mg
Fósforo	--	112
Vitamina A	19600	--
Vitamina B12	--	160
Vitamina E	112	--

Vitamina C	--	67.2
Vitamina B2	--	56
Vitamina B6	--	44.8
Biotina	--	15.68
Omega 3	--	369.6
Leucina	--	22.4
Lisina	--	22.4
Fenilalanina	--	22.4
Arginina	--	11.2
Isoleucina	--	11.2
Treonina	--	11.2
Metionina	--	11.2
Histidina	--	11.2

Tabla 8

Composición de mix de minerales en 25 mL

Compuesto	Cantidad (g)
NaCl	2.60
KCl	5.30
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.02
$FeSO_4 \cdot H_2O$	0.90
$ZnSO_4 \cdot H_2O$	0.04
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.03
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.50

3.1.2. Proceso de peletización

Para formar los pellets, todos los ingredientes mencionados previamente fueron procesados por extrusión casera con vapor, llegando a tamaños de 0,5 a 1 mm de diámetro con ayuda de una jeringa de 50 mL. Posteriormente, el resultado se secó en estufa a 40°C hasta presentar ≤ 5 % de humedad, se trituró para facilitar su ingesta y finalmente, se almacenó en recipientes de vidrio

previamente desinfectados hasta su uso (Thomas & van der Poel, 2020). Para constatar que la composición en la dieta sea la adecuada se emplearon los análisis presentes en la Tabla 9.

Tabla 9

Metodologías empleadas para análisis bromatológico

Macronutriente por analizar	Laboratorio privado	Laboratorio de Biotecnología
	Métodos de referencia	
Proteína (%)	Volumetría, Kjeldahl	Colorimetría, Bradford
Grasa (%)	Gravimetría, Soxhlet	Gravimetría, Soxhlet
Ceniza (%)	Gravimetría	*
Carbohidratos (%)	Cálculo Tabla de alimentos FAO	Colorimetría, Dubois
Calorías (kcal/100g)	NTE INEN 1334-2:2011/ Cálculo	*
Fibra bruta (%)	NTE INEN 522:2013/ Gravimetría	*

Nota. *: análisis no realizado

3.1.3. Ensayo de Bradford para cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas solubles, el método de Bradford genera cambios de color al promover la unión del tinte azul de Coomassie con los residuos de proteínas en medio ácido; posteriormente, mediante colorimetría, asociar la absorbancia de la muestra con las concentraciones de la curva de calibración elaborada a partir de un estándar de proteína. Para la elaboración de este ensayo se tomó como base los protocolos de Kielkopf et al. (2020) y el Laboratorio de Biotecnología Aplicada; la curva de calibración se realizó con suero de albúmina bovina (bovine serum albumin, BSA) partiendo de una concentración de 1 mg/mL, la cual fue

diluida 5 veces a la mitad con ayuda de buffer PBS 25nM (Tabla 10), dando como resultado soluciones de 1000 µL con concentraciones entre 0.5 y 0.0156 mg/mL. La cuantificación de proteínas en dietas A, B y biomasa de microalga requirió de un pretratamiento de las muestras, para lo cual se hizo soluciones de 0.1 g de muestra/mL buffer PBS y se llevó a sonicar por 40 minutos, 40 kHz y entre 5 a 10 °C, tras esto, se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se tomaron 30 µL del sobrenadante y se aforó a 1000 µL con buffer PBS; para la reacción colorimétrica se añadieron 1000 µL del reactivo de Bradford (Tabla 11). Por último, para la medición en espectrofotómetro, se usó una solución 1:1 (v/v) de agua y reactivo de Bradford como blanco y se midió a una longitud de onda de 595 nm tras 10 minutos de haber añadido el reactivo de Bradford. Los valores de absorbancia para la curva fueron presentados en un gráfico de dispersión con Absorbancia (Y) vs Concentración de estándar (X). Los valores de mg equivalentes a BSA por mL obtenidos con ayuda de la ecuación de la recta fueron multiplicados por un factor de dilución (FD) de 366.67 y transformados a porcentaje con la Ecuación 1

$$\%\ de\ proteína\ en\ muestra = \frac{\left(\frac{mg\ eq.BSA}{mL} * 366.67\right) * 100\%}{100\ mg} \qquad (1)$$

Tabla 10

Preparación de 300 mL solución de buffer PBS 25 nM

Reactivo	**Cantidades**
Fosfato monosódico	1.39 g
Fosfato disódico	2.61 g
Agua destilada	300 mL

Tabla 11

Reactivos para preparación de 500 mL de reactivo de Bradford

Reactivo	Cantidades
Agua destilada	425 mL
Etanol 95%	25 mL
Ácido fosfórico (85%)	50 mL
Azul de Coomasie	50 mg

3.1.4. Ensayo de Fenol-sulfúrico (Dubois) par cuantificación de carbohidratos totales.

El método Dubois et al., (1951) permite la cuantificación de carbohidratos totales por colorimetría al producir coloración como resultado de la reacción entre los azúcares presentes en la muestra, fenol y ácido sulfúrico concentrado, dicha coloración se relaciona con las concentraciones conocidas de un estándar de carbohidratos. Como estándar se empleó glucosa anhidra, de la cual se tomaron 100 mg y aforó a 100 mL con agua destilada, llegando a una concentración de 1 mg de glucosa/mL. De la solución de 1 mg/mL se tomaron 1.2 mL para diluirlo a 10 mL dando una concentración final de 120 µg/mL, posteriormente esta solución se volvió a diluir para obtener las siguientes concentraciones: 0, 24, 48, 72, 96, 120 µg de glucosa/mL. En esta ocasión fue necesario el pretratamiento de las muestras de dietas A, B y biomasa de microalga; de cada una se tomaron 100 mg y se diluyeron en 1.5 mL de ácido sulfúrico 1 M para promover la hidrólisis de carbohidratos complejos. Esta solución se llevó a sonicar por 30 min, 40 kHz y entre 5 a 10 °C; finalmente, se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos para obtener el sobrenadante, del cual se tomó 1 mL para diluirse con 9 mL de agua destilada en tubos de vidrio. Para la reacción colorimétrica, se tomaron 500 µL de la solución de Fenol 5%, 500 µL de las soluciones con carbohidratos y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, tratando de liberar rápidamente el ácido para obtener una mezcla homogénea con las dos soluciones previas, esto se realizó con cada una de las muestras a medir. Se recomienda realizar este paso en tubos de vidrio para evitar daños de

material por la liberación de calor. Tras este paso se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm empleando como blanco una solución compuesta por 500 de agua, 500 µL de la solución de Fenol 5% y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (Masuko et al., 2005). De la misma forma que para el ensayo de Bradford, se empleó un gráfico de dispersión con Absorbancia vs Concentración de estándar. Los valores de mg equivalentes a glucosa anhidra por mL, obtenidos con ayuda de la ecuación de la recta, fueron multiplicados por un FD igual a 70 y transformados a porcentaje con la Ecuación 2.

$$\%\ de\ carbohidratos\ en\ muestra = \frac{\left(\frac{mg\ eq.\ Glucosa}{mL} * 70\right) * 100\%}{33.33\ mg} \qquad (2)$$

3.1.5. Cuantificación de grasa mediante Soxhlet

Empleando un equipo de extracción de grasas tipo Soxhlet (Raypa, Soxtest) y protocolo facilitado por el Laboratorio Fisicoquímico y Microbiológico ubicado en el Campus San Vicente de Paul, se midió la cantidad de grasa total en cada muestra, se empleó éter de petróleo 40-60 °C como solvente, el recipiente que lo contuvo fue previamente pesado para restar su masa al finalizar el procedimiento, posteriormente se pesó 1 g de las muestras de dietas A, B y biomasa de microalga previamente secadas, trituradas y colocadas en un dedal de celulosa, este fue sumergido en 45 mL de éter de petróleo durante 15 minutos con el equipo funcionando a 110 °C. Posteriormente se realizó un lavado durante 30 minutos para retirar toda la grasa presente dentro del dedal de celulosa; tras el lavado, se recuperó parte del solvente para su reutilización, este proceso duró 35 minutos; a continuación, la grasa arrastrada hacia el recipiente bajo el dedal fue llevada a un horno de estufa durante 30 minutos a 105 °C para evaporar posibles trazas de solvente, posteriormente el recipiente se llevó a una balanza analítica para ser pesado, el valor obtenido se restó con el valor

del recipiente tomado inicialmente y el resultado corresponde a la cantidad (g) de grasa en 1g de muestra, este valor se reportó como porcentaje con ayuda de la Ecuación 3.

$$grasa\ (\%) = \frac{(masa\ final - masa\ recipiente)\ g}{1g\ de\ muestra} * 100\% \quad (3)$$

3.2. *Manejo del modelo animal y suministración de la dieta*

Para establecer la diferencia entre los efectos de la dieta, el sexo y su interacción se empleó un análisis de varianza con transformación alineada por rangos (Aligned Rank Transform, ART ANOVA), utilizando un diseño factorial de AxB donde el primer factor es el tipo de dieta (A, B y control) y el segundo el sexo (macho y hembra), este diseño permite evaluar diferencia significativas para datos que no cumplan con los supuestos estadísticos de distribución normal y homogeneidad de varianzas. Como dieta control se tuvo un alimento estándar sin microalga de origen comercial ya establecido con anterioridad en el Laboratorio de Biotecnología. Las variables de respuesta fueron: el FCR (Ecuación 4); la SGR (Ecuación 5); y los porcentajes de ganancia o pérdida de masa y longitud tomando como referencia las mediciones del día 1 y día 30. Para el análisis estadístico se usó el software R versión 4.6.0 en el entorno de trabajo RStudio versión 2026.04.0 con los paquetes ARTool para el análisis de varianza no paramétrico y los paquetes emmeans y multcomp para comparaciones múltiples (Hothorn et al., 2008; R Core Team, 2026; Lenth & Piaskowski, 2026; Kay et al., 2025).

$$FCR = \frac{cantidad\ de\ dieta\ suministrada\ g}{masa\ final\ pez - masa\ inicial\ pez\ g} \quad (4)$$

$$SGR = \frac{\ln(masa\ de\ pez\ g)_{final} - \ln(masa\ de\ pez\ g)_{inicial}}{tiempo} * 100 \quad (5)$$

Los peces fueron mantenidos en el laboratorio de Biotecnología Vegetal ubicado en el campus San Vicente de Paul de la ciudad de Ibarra. Ejemplares adultos masculinos y femeninos

de aproximadamente 1 año se usaron como modelos animales para suministrar las dietas experimentales. Se tuvieron 6 peceras de 7 litros (2 por tratamiento) con 5 peces en cada una para mantener la relación de máximo 1 pez/L de agua; los parámetros en cada estanque se midieron y controlaron con la finalidad de favorecer la supervivencia y disminuir factores de estrés externos, tomando en cuenta el pH (7 – 8), oxígeno disuelto (> 5 mg/L), conductividad (150 - 1700 µS/cm), cantidad de amonio (0 mg/L), nitritos (0 mg/L), nitratos (< 50 mg/L), temperatura (25 – 28 °C) y un periodo de 12/12 luz/oscuridad, como lo establece Darwish et al. (2023).

El alimento formulado se suministró a los peces tomando como referencia el 3.5% de su masa, cuya cantidad se proporcionó en dos partes, a las 08:00 y 15:00 horas durante un periodo de 30 días con un periodo extra de adaptación, previo a los 30 días de experimentación, con una duración de7 días, se esperó diez minutos para que los peces consuman la mayoría del alimento y lo que no se consumió se extrajo para evitar su descomposición y afectar la calidad del agua. (Frederickson et al., 2021).

3.3. *Pesaje y medición longitudinal de los peces*

Para cada ejemplar se pesó recipientes plásticos de 25 mL de capacidad conteniendo 15 mL de agua, posteriormente, se añadió un pez a cada recipiente y se registró la diferencia de masa entre recipiente, agua y pez; este procedimiento fue realizado al iniciar la experimentación y cada 7 días durante un mes.

El procedimiento de medición se realizó los mismos días que el pesaje; se tomaron videos desde la vista aérea de un recipiente transparente que albergaba a todos los especímenes. Como referencia de la escala se incluyó una regla de 15 cm con divisiones milimétricas dentro del campo de grabación; a partir de los videos, se extrajeron fotogramas donde los peces se encontraron con un eje corporal recto, la imagen sea nítida y no exista distorsión alguna por los bordes del

recipiente; finalmente, con ayuda del software ImageJ, se configuró una escala con ayuda de la medida de referencia y se realizó 5 mediciones longitudinales desde la punta de la nariz hasta el inicio de la aleta caudal para tener un promedio y reducir error de medición.

Con las medidas de masa y longitud tomadas previamente, se procedió a calcular además el factor de condición K (Ecuación 6) como variable adicional y con esto poder registrar los cambios en condición durante todo el mes.

$$K = \frac{(Masa\ g) * 10^5}{(Longitud\ mm)^3} \quad (6)$$

CAPÍTULO IV

4. Resultados y discusión

4.1. *Formulado de las dietas experimentales*

La programación lineal en Solver dio como resultado las proporciones que se observan en la Tabla 12, junto con los rangos a los que se llegó para macronutrientes y la proporción de estos, calculada tras la adición del 10% de biomasa en el dieta B. Cabe recalcar que las proporciones son netamente teóricas y depende del conocimiento previo de los perfiles nutricionales perteneciente a cada ingredientes.

Tabla 12

Porcentaje de ingredientes presentes en dieta A y B

		Dieta A		
Ingrediente	**Porcentaje en dieta**	**Lípidos (%)**	**Carbohidratos (%)**	**Proteína (%)**
AC	13.17*	13.17	0.00	0.00
HA	56.29*	0.00	37.53	11.26
HP	30.54*	2.14	0.00	13.74
Total	**100.00**	**15.31**	**37.53**	**25.00**

Dieta B				
AC	13.17	13.17	0.00	0.00
HA	56.29	0.00	37.53	11.26
HP	20.54	1.44	0.00	9.24
Mic	10.00	1.80	1.45	3.00
Total	**100.00**	**16.41**	**38.98**	**23.50**

Nota. *: valores aportados por Solver; los aportes de microalga fueron estimados mediante bibliografía.

Por otra parte, en la Tabla 13, el análisis bromatológico reflejó que los valores teóricos previos no son iguales a los obtenidos mediante análisis, esto puede deberse a inconsistencias en el perfil nutricional de la harina de pescado ya que esta no se consiguió en un supermercado sino en una tienda local de insumos para ganado, sumando a la falta de información en cuanto al perfil nutricional de la biomasa, generan resultados adversos a lo esperado. Además, enfocándose solamente en el análisis, si bien existen diferencias remarcables entre los valores para las variables de grasa, carbohidratos y calorías aportadas, estos resultados no permiten determinar la composición precisa aportada por la biomasa de microalga. Por otra parte, se puede establecer que las dietas formuladas son isonitrogenadas, variando en menos del 1 % en composición de proteínas (21.33±0.13), sin embargo, no podrían considerarse isoenergéticas ya que varían aproximadamente 9 % en su aporte calórico, dicha diferencia se debe a que la biomasa de microalga no pudo ser analizada con anterioridad a la formulación de la dieta y se recurrió a valores estimados por las investigaciones de Gadzama et al. (2025), Canelli et al. (2020), Gao et al. (2024) y Mtaki et al. (2021) que reportaron valores de proteína cruda entre 18 y 67 %, lípidos entre 7 y 24% y carbohidratos 12 y 65 % dependiendo de las condiciones de cultivo, lo cual indica que la especie empleada posee amplia variabilidad nutricional y poca previsibilidad.

Tabla 13

Dietas experimentales formuladas y control

Componente	A	B	C
Proteína (%)	21.46	21.2	47.5
Grasa (%)	14.88	22.57	6.5
Ceniza (%)	3.77	3.77	nd[a]
Carbohidratos (%)	52.34	45.01	38[b]
Calorías (Kj/g)	17.95	19.58	16.94[c]
Fibra bruta (%)	0.78	0.76	2

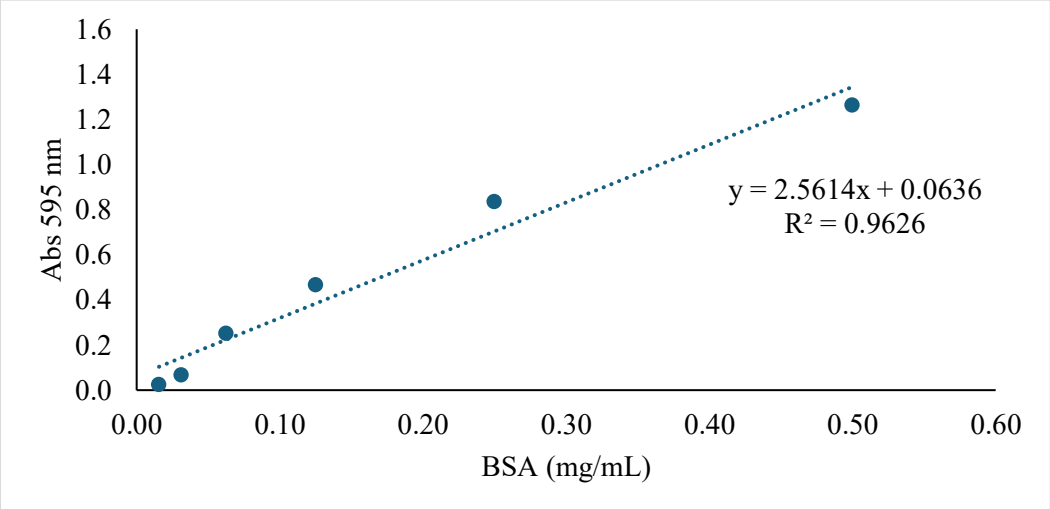
Nota. [a] valores no proporcionados por la descripción del producto; [b] valor estimado por diferencia; [c] valor obtenido mediante NTE INEN 1334-2:2011.

4.1.1. Cuantificación de proteínas

A partir del ensayo de Bradford se determinó el aporte nutricional de proteína correspondiente a cada dieta y a la biomasa de microalga por separado, para la cual se utilizó la curva de calibración resaltada en la Figura 1.

Figura 1

Curva de calibración con BSA



Se obtuvieron los valores de 35.65, 20.67 y 20.01% para la biomasa de microalga, dieta A y dieta B respectivamente, indicando para la dieta A y B son consistentes con el análisis bromatológico previo, además, se cuestiona la composición proteica aportada por la harina de pescado, esto puede deberse al origen de la harina de pescado ya que pudo sufrir un cambio o degradación en su composición y por lo tanto contener niveles inferiores de proteína neta que la reportada. En el caso de la biomasa, esta se encuentra dentro de los rangos mencionados con anterioridad.

4.1.2. Cuantificación de grasas

De los ensayos de cuantificación de grasas por Soxhlet se obtuvieron como resultado valores de 1.71, 15.8 y 15.38 % para la biomasa de microalga, dieta A y dieta B respectivamente. Estos valores se encuentran cercanos a aquellos reportados previamente en el análisis bromatológico y permite resaltar la cantidad neta de grasa presente en la biomasa de microalga, dando valores inferiores al rango entre 8 y 24%, valores reportados por Canelli et al. (2020) y Mtaki et al. (2021), esto puede deberse específicamente a las condiciones de cultivo ya que Grubišić et al. (2024) reporta que, en condiciones de cultivo autótrofo con luz como principal fuente de energía, se reduce aproximadamente 60 veces la cantidad de lípidos producidos que en cultivos heterótrofos; de igual manera Poh et al. (2020) menciona que el rendimiento de lípidos bajo entornos con estrés inducido llega a ser superior al doble que en entornos bajo condiciones estables. Además, Lv et al. (2010) establece que si se sobrepasan las 90 horas de cultivo (4.17 días) la productividad de lípidos decrece mientras la cantidad de biomasa aumenta; como punto adicional, según Widjaja et al. (2009), la temperatura de extracción de aceites influye en el rendimiento, bajando de un 52% a un 48% entre 60 y 100 °C, aunque no se reduzca

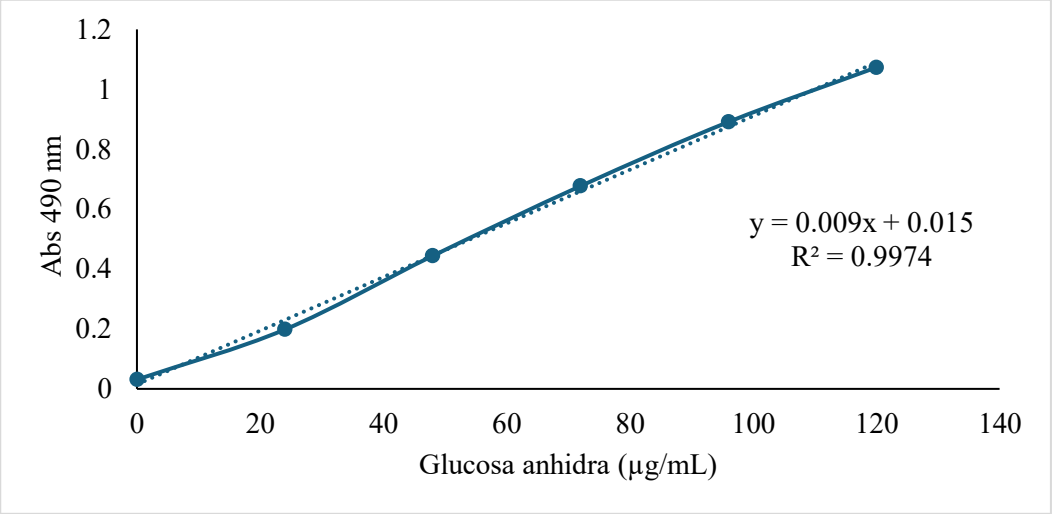
considerablemente, en este caso pudo haber influido ya que la temperatura de secado fue cercana a 75 °C.

4.1.3. Cuantificación de carbohidratos

En la Figura 2 se observa la curva de calibración obtenida para la estimación de la concentración y posterior porcentaje de carbohidratos en las dietas y biomasa.

Figura 2

Curva de calibración con glucosa anhidra



Se obtuvo los valores de 14.45, 20.45 y 15.19 % para la biomasa de microalga, dieta A y dieta B respectivamente; en los cuales se evidencian disminución en las composiciones de las dietas A y B en concordancia con el análisis bromatológico, esto puede atribuirse a las cantidades limitadas de dietas producidas. La elaboración de bajos volúmenes implica también un incremento en la influencia de la heterogeneidad y el error de muestreo; la producción de lotes más grandes podría dar muestras más representativas y reducir la variabilidad analítica. En cuanto a los carbohidratos totales correspondientes a la biomasa, el resultado se encontró dentro de los rangos

mencionados con anterioridad por Gadzama et al. (2025), Canelli et al. (2020), Gao et al. (2024) y Mtaki et al. (2021).

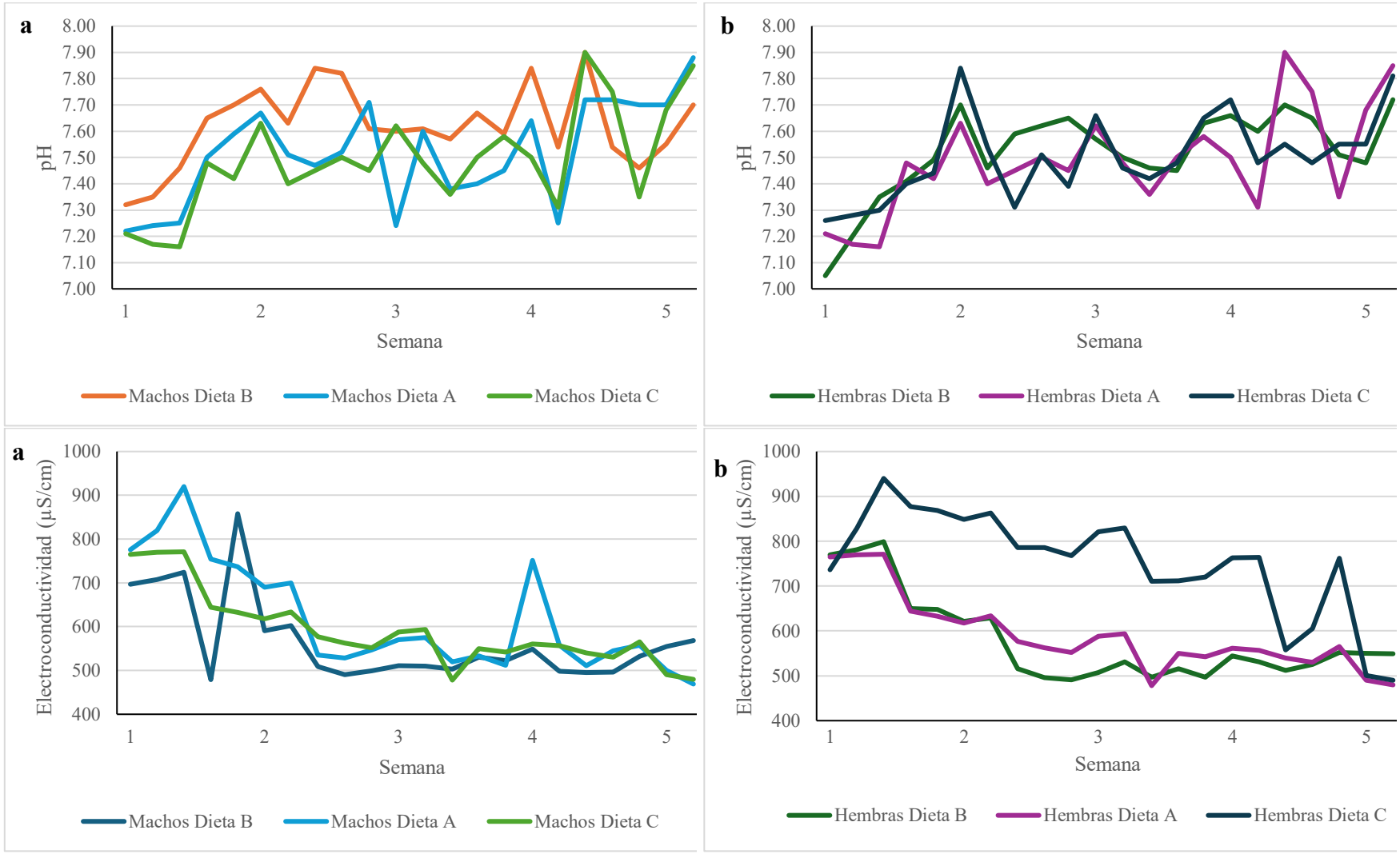
4.2. *Manejo del modelo animal*

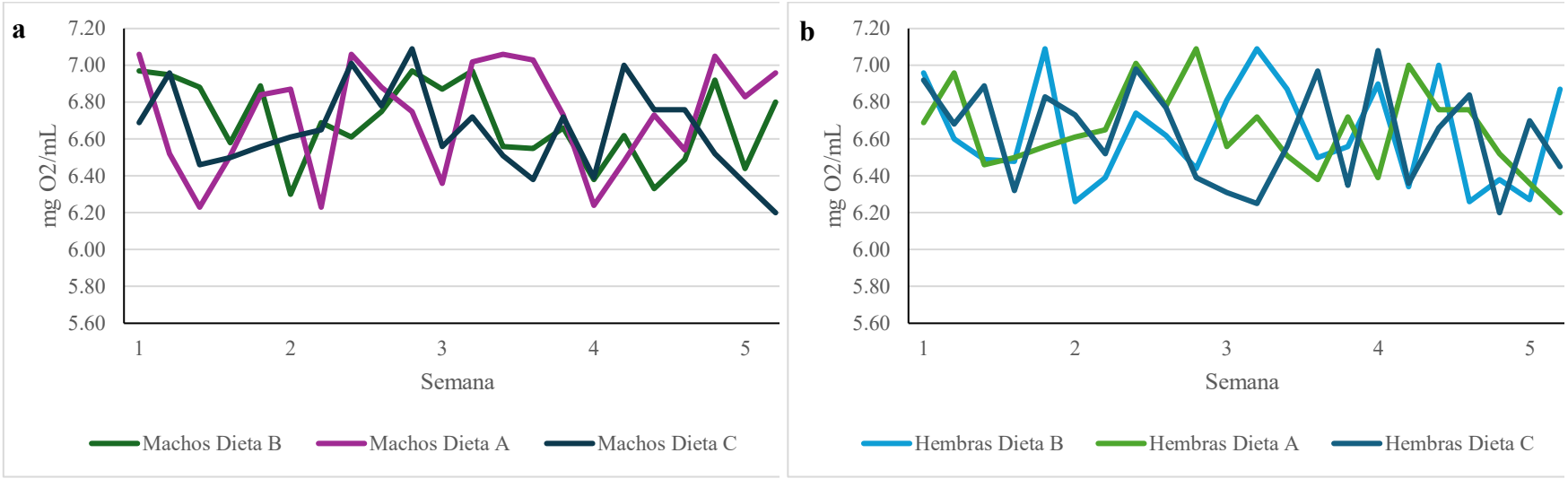
Durante el periodo de experimentación con las dietas formuladas, los valores de pH oscilaron entre 7.05 y 7.90; conductividad eléctrica entre 469 y 940 µS/cm; y oxígeno disuelto entre 6.20 y 7.09 mg/mL, indicando que se mantuvieron dentro de los parámetros adecuados establecidos en la Tabla 1; la variación de estos parámetros, para cada dieta, a lo largo de la experimentación se observa en la Figura 3 y estas pudieron deberse a remplazos periódicos de 10 % del agua total y acondicionamiento del medio para cada pecera. En cuanto a los niveles de nitritos, nitratos y cloro, estos se encontraban nulos o en cantidades despreciables; gracias a esto puede descartarse posibles alteraciones durante el experimento debido a factores ambientales. Sin embargo, debe tomarse en cuenta el estrés producido durante los procedimientos de pesaje, medición y mantenimiento de las condiciones ideales.

La tasa de supervivencia durante la experimentación fue del 100 %, por lo cual se puede inferir que las dietas experimentales A y B no tuvieron efectos tóxicos a corto plazo. Además, no se observaron signos aparentes de estrés ni diferencias conductuales entre los peces alimentados con las dietas experimentales y aquellos que tuvieron la dieta control. De la misma forma, los organismos mantuvieron patrones de comportamiento habituales durante todo el periodo experimental, incluyendo su permanencia frecuente en las zonas superiores de la columna de agua durante las etapas de alimentación.

Figura 3

Monitoreo de parámetros durante el periodo de experimentación





Nota. a: valores para machos; b: valores para hembras

4.3. *Pesaje y medición de especímenes*

A continuación, en la Tabla 14 se presentan los resultados del ANOVA ART realizado para los porcentajes de ganancia o pérdida de masa y longitud para cada tratamiento al finalizar los 30 días de fase experimental, de estos resultados se obtuvo significancia estadística: para la variable masa, el factor Sexo, con un valor p = 0.027, indica que las dietas no difieren entre sí, pero los machos tuvieron un mayor porcentaje de ganancia que las hembras independientemente de la dieta suministrada; mientras que para la variable longitud, el factor Dieta y la interacción Sexo*Dieta, fueron significativos con valores p de 0.015 y 0.0003 respectivamente, lo cual indica que el efecto de la dieta sobre esta variable dependió del sexo de los peces, no hay una dieta mejor que funcione para ambos sexos. Para evidenciar de mejor manera el análisis estadístico, en la Figura 4 se observa como en el caso de la masa, los machos tuvieron valores de 12.16, 8.93 y 22.58 % para las dietas B, A y C respectivamente, mientras que las hembras tuvieron valores de 2.50, 8.39 y 3.61 %. En cuanto a la variable longitud, las pruebas post hoc mostraron diferencia entre el efecto de la dieta A en machos y la dieta A en hembras, ya que los machos perdieron 5.13 % de su longitud y las hembras ganaron 3.38 %. Estos resultados contrastan en gran medida con los obtenidos por Valentine y Kwasek (2022), que obtuvieron porcentajes superiores a 300 en ganancia de masa con alimento suministrado por restricción de masa en ejemplares con edad entre 33 y 47 días post fecundación. De igual manera, Carneiro et al. (2020) reporta porcentajes entre 150 y 170 para dietas con reemplazo de biomasa de microalga *Chlorella sp.* en ejemplares con edad de 30 días post fecundación; en adición Aiyelari y Chaudhry (2020) también presentan un aumento de masa corporal entre 150 y 200 % con ejemplares juveniles, con lo cual se puede inferir que la edad es determinante en la ganancia de masa, al igual que puede serlo el porcentaje de proteína presente en la dieta, ya que todos los estudios previos mostraron valores superiores a 30 %, sin embargo,

este no es el caso para este estudio ya que la dieta estándar empleada presentó niveles de proteína de 47 % y no tuvo resultados positivos que difieran significativamente con los obtenidos por las dietas experimentales.

Tabla 14

Resultados del ANOVA ART para el porcentaje de variación de masa y longitud

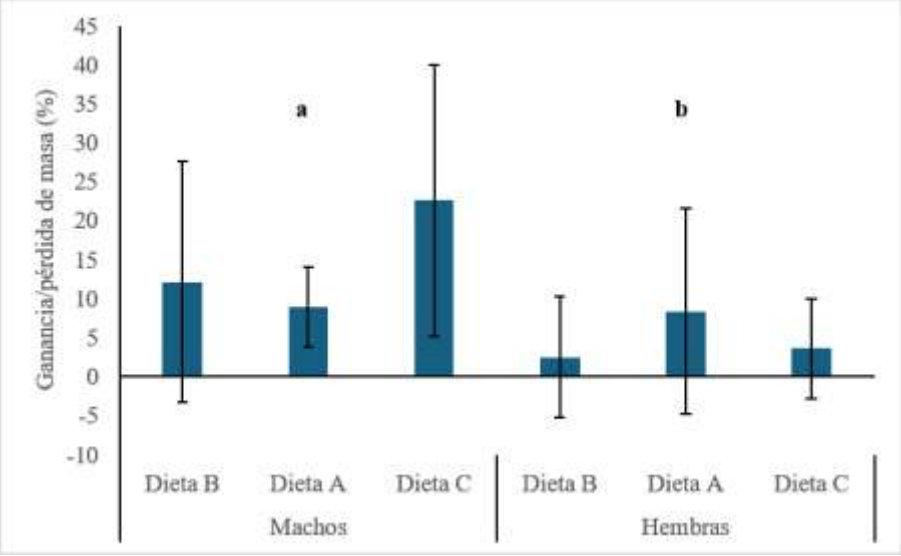
				Masa			
	SS	***df1***	***df2***	***MS***	***F***	***p-value***	***p eta-sq***
Sexo	410.70	1	24	410.70	5.57	0.0268*	0.19
Dieta	99.80	2	24	49.90	0.57	0.5706	0.05
Sexo*Dieta	145.87	2	24	72.93	0.86	0.4376	0.07
				Longitud			
	SS	***df1***	***df2***	***MS***	***F***	***p-value***	***p eta-sq***
Sexo	80.03	1	24	80.03	0.91	0.3498	0.04
Dieta	661.40	2	24	330.70	5.02	0.0151*	0.29
Sexo*Dieta	1112.27	2	24	556.13	11.77	0.0003*	0.50

Nota. *Significativo

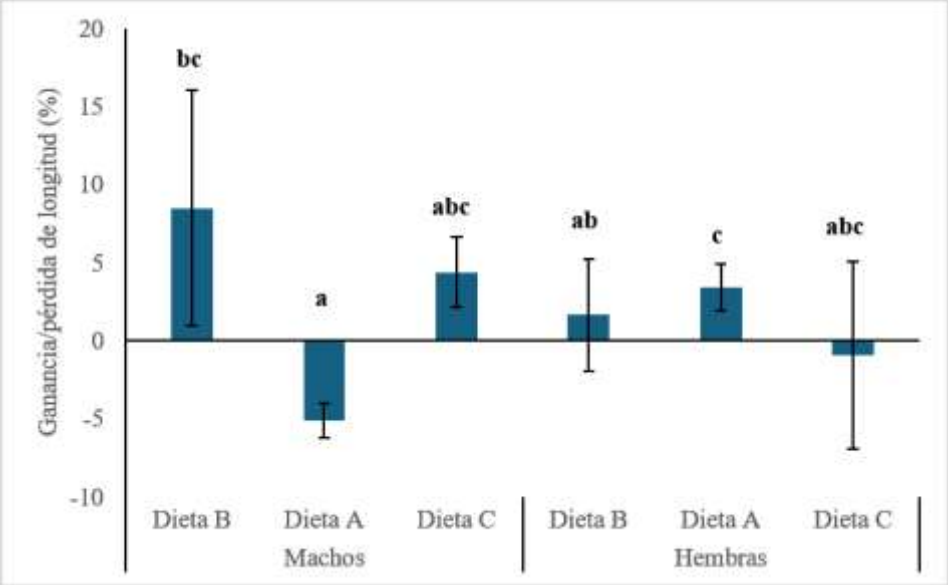
Figura 4

Variación porcentual de masa y longitud al final de la experimentación

a



B



Nota. a: Variable masa; b: variable longitud

4.4. *Análisis de índices de crecimiento*

4.4.1. Eficiencia nutricional

Los resultados para la variable FCR (Tabla 15) no indicaron diferencias significativas entre tratamientos (valores $p > 0.05$ para factores en estudio e interacción) y sugiere que los ejemplares tuvieron una respuesta similar a las dietas evaluadas, en adición, en la Figura 5 se puede destacar que los valores para la dieta B indican las medias más bajas para machos y hembras, siendo 4.2 y 2.4 g alimento/gramos de masa corporal respectivamente, lo cual puede deberse a que la dieta B tenía una mayor proporción de carbohidratos y lípidos y por consiguiente el peso de los ejemplares aumentaba con mayor facilidad que con la dieta C, cabe destacar que las hembras y machos alimentados con la dieta C tienen diferentes medias debido a que las hembras destinan mayor parte de los nutrientes a procesos reproductivos del mismo modo que lo menciona Fowler et al. (2019). Los valores obtenidos para cada dieta son muy inferiores a los obtenidos por Aiyelari y Chaudhry (2020) en donde los FCR no superan 1 g alimento/g masa corporal, lo cual indica que en esta

ocasión las dietas pudieron ser ineficientes en la ganancia de masa corporal. Además, los valores de FCR son estimados con un porcentaje de 10 % de alimento no consumido debido a que el tamaño del pienso también ocasiona que parte del alimento se disuelva en el agua y se pierda, este es un aspecto difícil de controlar ya que, si se cambia el tamaño del pienso, los peces pueden ignorar el alimento por completo al ser demasiado grande.

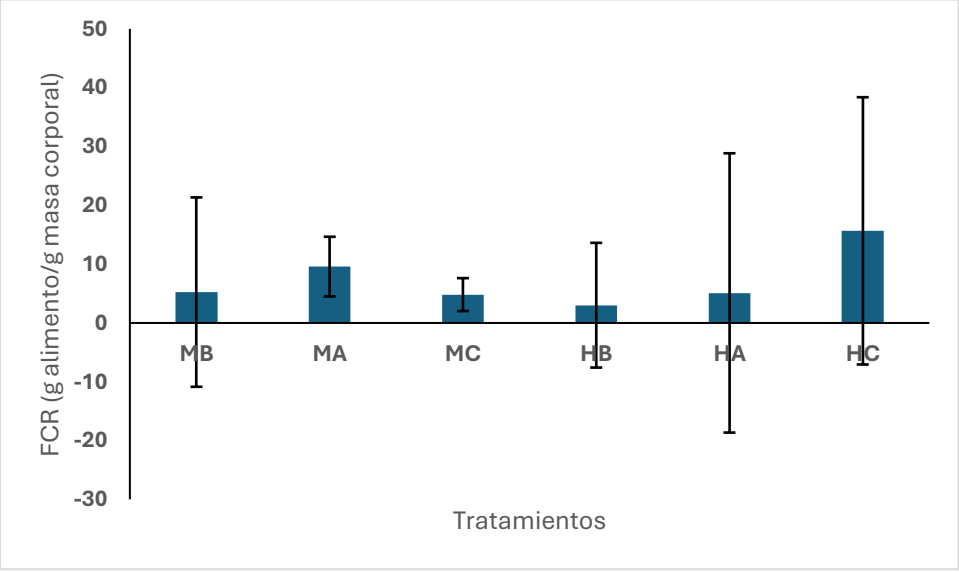
Tabla 15

Resultados del ANOVA ART para la variable FCR

	SS	***df1***	***df2***	***MS***	***F***	***p-value***	***p eta-sq***
Sexo	288.3	1	24	288.3	3.76	0.06	0.14
Dieta	153.8	2	24	76.9	1.07	0.36	0.08
Sexo*Dieta	99.8	2	24	49.9	0.66	0.53	0.05

Figura 5

Gramos de alimento necesarios para producir un gramo de biomasa por tratamiento



Nota. M: machos; H: hembras. A, B y C: dietas

4.4.2. Crecimiento somático

Los resultados presentes en la Tabla 16 corresponden a los valores para la variable SGR, donde se observa que no existen diferencias significativas entre tratamiento (valor $p > 0.05$), al igual que con la variable FCR. Mediante un análisis visual de la Figura 6 se destaca que las medias tuvieron valores inferiores a 1%; estos resultados contrastan con los obtenidos por Carneiro et al. (2020) en donde dietas sin y con microalga tuvieron resultados superiores a 1 %, sin embargo, esto puede deberse a que los ejemplares empleados estaban en etapa juvenil mientras que los que se usaron en este estudio fueron ejemplares adultos y esto va acorde con en el estudio de Lawrence et al. (2012) donde los valores de SGR a partir de los 150 días post fertilización se redujeron a 1 % o incluso a valores negativos. Además, según Krause et al. (1999), que estudió comportamiento de peces tras 48 horas de falta de alimento, advirtió que esto puede ocasionar asilamiento en los ejemplares, consumiendo menor alimento, lo cual es importante al tomar en cuenta que durante esta experimentación no fue posible alimentar a los peces en fines de semana. Por otra parte, es posible que la disminución en el consumo de la dieta no se deba a la palatabilidad ya que la microalga fue implementada en bajas concentraciones como lo establece Pascon et al. (2021). Del mismo modo, Valente et al. (2019) comprobó que al reemplazar aproximadamente el 15% de la harina de pescado con biomasa de *Nannochloropsis sp.* no se observó afectaciones en crecimiento.

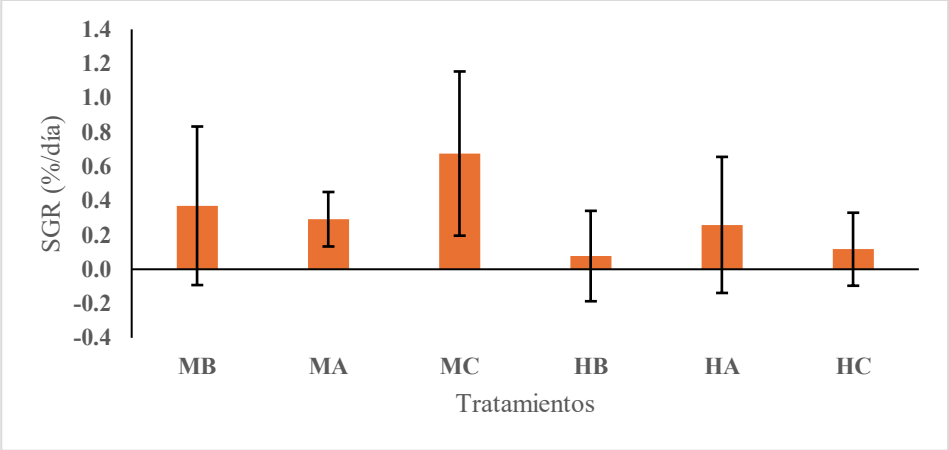
Tabla 16

Resultados del ANOVA ART para la variable SGR

	SS	***df1***	***df2***	***MS***	***F***	***p-value***	***p eta-sq***
Sexo	264.03	1.00	24.00	264.03	3.44	0.08	0.13
Dieta	153.80	2.00	24.00	76.90	0.93	0.41	0.07
Sexo*Dieta	31.27	2.00	24.00	15.63	0.18	0.84	0.01

Figura 6

Porcentaje de ganancia de masa por día para cada tratamiento



Nota. M: machos; H: hembras. A, B y C: dietas

4.4.3. Condición fisiológica

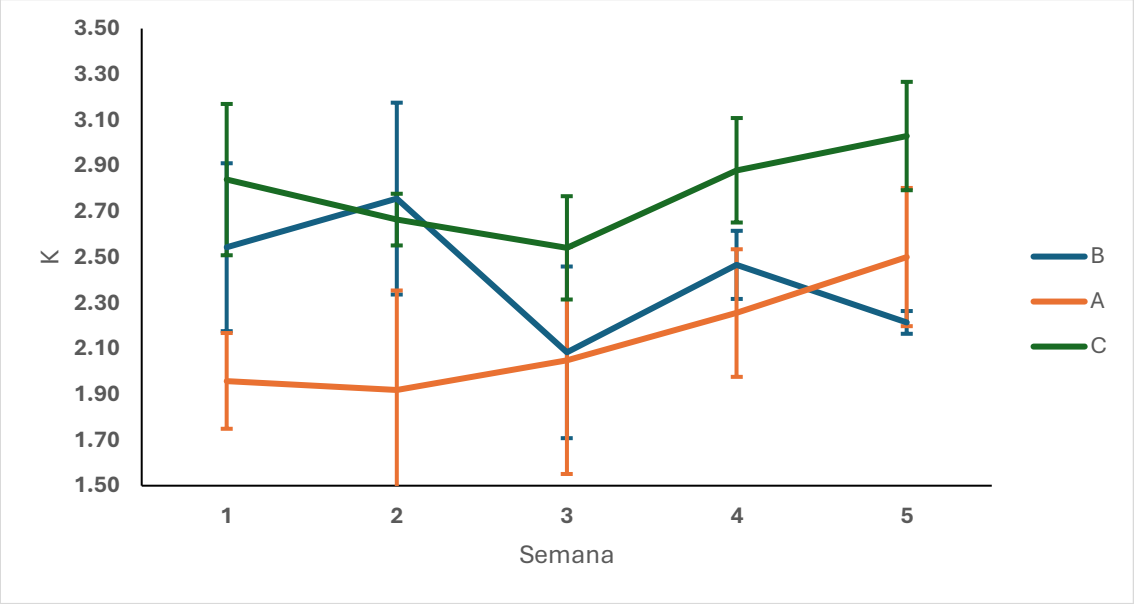
Los resultados del factor K (1.87 – 3.03) y su variación a lo largo de la experimentación se encuentran mayormente dentro de los valores obtenidos en la investigación de Clark et al. (2018), que obtuvo un rango entre 0.83 y 2.96, sin embargo, dado que no todo este rango corresponde a una condición adecuada, basándose en la misma investigación, podría estimarse que los valores centrales de este rango son cercanos a los correspondientes a un pez en buenas condiciones, aproximadamente entre 1.5 y 2, lo cual establece que solamente el 3 % de los datos presentados en la Figura 7 entran en esta categoría; sin embargo, O'Brine et al. (2015) establece que el factor de condición K se interpreta como una predicción en las reservas energéticas más que un indicador de buena condición ya que dietas que presenten niveles de grasa cercanos a 16 % promueven un aumento en depósitos de grasa y por lo tanto, un aumento en los índices K, con valores cercanos a 2.5. Al analizar la evolución del índice evaluado (Figura 7), los machos presentaron menor estabilidad para la dieta B ya que incluso se observa cruzamiento entre las demás dietas, mientras que las hembras tuvieron cambios más estables. Uno de los principales factores que pudo influir en esta variable es la edad de los especímenes, siendo más habitual emplear organismos de 28 a 196 días post fecundación, entre un estadio juvenil y adulto (Darwish et al., 2023; Truzzi et al.,

2022; Truzzi et al., 2023). Se observaron patrones similares a los observados por Fowler et al. (2019) en donde a pesar de haber proporcionado la misma cantidad de alimento a todas las peceras, la aceptación del alimento fue variable.

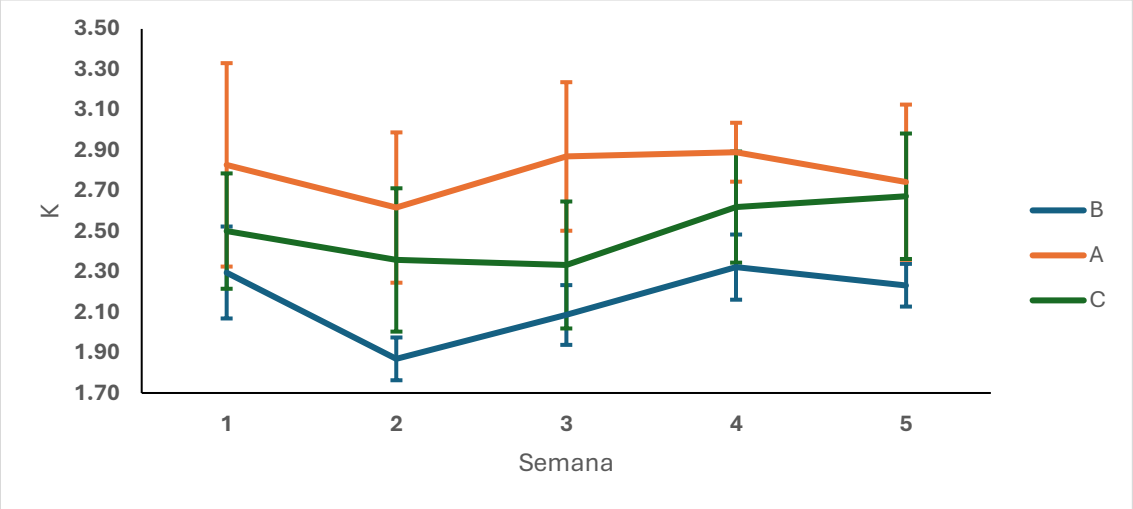
Figura 7

Variación en el valor K durante la suministración de la dieta

a



b



Nota. a: Valores correspondientes a machos; b: valores correspondientes a hembras

CAPÍTULO V

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. *Conclusiones*

La herramienta Solver fue efectiva en la formulación de las dietas experimentales, cumpliendo con los requerimientos nutricionales para la especie *Danio rerio*, sin embargo, la composición final depende netamente del conocimiento y la fiabilidad de la composición detallada de los ingredientes, no cumplir este requerimiento ocasionaría dietas desbalanceadas o que el software no sea capaz de dar una posible solución; por otra parte, los ingredientes seleccionados para la preparación permitieron distribuir de manera adecuada la proporción de los macronutrientes y no hubo inconvenientes en este aspecto con la herramienta Solver.

Dado que se obtuvieron diferencias en las composiciones nutricionales de las dietas A y B en relación con los valores obtenidos tras el análisis bromatológico realizado en un laboratorio privado, los resultados reportados tras los ensayos de cuantificación de carbohidratos deben interpretarse como valores mínimos estimados, asegurando una composición mínima de 20.45 y

15.19 % para la dieta A y B respectivamente. Además, las discrepancias con la composición previa no implican un error, sino que responden a la variabilidad inherente a las matrices sólidas donde la heterogeneidad de la muestras y las condiciones de análisis pueden influir en los resultados.

La respuesta frente al efecto de cada dieta difiere entre machos y hembras, más esta diferencia radica en la variable analizada. En el caso de la masa, aunque los efectos en cada tratamiento fueron positivos, fue más notorio el efecto en machos que en hembras; para la variable longitud, las dietas A y C mostraron efecto opuesto entre machos y hembras; únicamente la dieta B permanece con medias positivas para ambas variables y en ambos sexos, indicando que esta dieta tiene efectos similares independientemente del sexo.

La evidencia disponible no permite establecer un efecto concluyente de las dietas para los indicadores de FCR y SGR, asimismo no se puede inferir superioridad o efectos adversos asociados a las dietas formuladas, y gran parte de los resultados pueden verse influenciados por la edad de los organismos evaluados ya que para este estudio estos sobrepasaron los 4 meses y su crecimiento supera el de una etapa exponencial, pasando a una estacionaria por ser organismos maduros.

Las dietas formuladas permitieron el mantenimiento de peces cebra en igual medida que la dieta estándar basándose en los valores obtenidos para FCR, SGR y K, en donde los resultados permiten sugerir una condición saludable para cada tratamiento. Cabe recalcar que, aunque en gran variedad de los estudios con peces se emplee el factor de condición K, la falta de estandarización en cuanto a factores de condición para el pez cebra debido a su tamaño, hacen que pueda debatirse su efectividad en esta especie al igual que el IMC debido a que no se considera el dimorfismo sexual; a pesar de esto, los resultados de este estudio permiten estimar la validez de este al ser tomado con un indicador complementario que refuerce el análisis cuantitativo principal.

5.2. *Recomendaciones*

- Considerar el uso de organismos experimentales de mayor tamaño para realizarse un estudio de digestibilidad aparente, esto permitiría tener un panorama más claro de los niveles de macronutrientes digeridos por el animal.
- Evaluar la posible variación en la microbiota intestinal para determinar indicios de alteración en procedimientos fisiológicos normales, tomando en cuenta su contribución en la degradación de alimentos y su aprovechamiento por el espécimen
- Tomar a consideración extender el tiempo de acondicionamiento a las dietas para evitar una baja ingesta del alimento formulado, tomando un mes como referencia.

CAPÍTULO VI

6. Referencias Bibliográficas

Ahmad, A., W. Hassan, S., & Banat, F. (2022). An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: food security and circular economy. *Bioengineered*, *13*(4), 9521–9547. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061148

Aiyelari, T. A., & Chaudhry, A. S. (2020). Plant protein-based diets can replace a fish meal-based diet for sustainable growth and body composition of zebrafish. *BioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. https://doi.org/10.1101/2020.05.18.101733

Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P. J., Schorderet, D. F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., & Warner, S. (2019). Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Laboratory Animals*, *54*(3), 213–224. https://doi.org/10.1177/0023677219869037

AllTech Coppens. (2022). Proteínas alternativas; y por qué debemos dejar de usar esa frase. *AquaFeed and Fish Farming Technology*. https://aquafeed.es/proteinas-alternativas-y-por-que-debemos-dejar-de-usar-esa-frase-53920/

Annamalai, S. N., Das, P., Thaher, M. I. A., Abdul Quadir, M., Khan, S., Mahata, C., & Al Jabri, H. (2021). Nutrients and Energy Digestibility of Microalgal Biomass for Fish Feed Applications. *Sustainability*, *13*(23), 13211. https://doi.org/10.3390/su132313211

Ansari, F. A., Guldhe, A., Gupta, S. K., Rawat, I., & Bux, F. (2021). Improving the feasibility of aquaculture feed by using microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(32), 43234–43257. https://doi.org/10.1007/s11356-021-14989-x

Bongiorno, T., Foglio, L., Proietti, L., Vasconi, M., Moretti, V. M., Lopez, A., Carminati, D., Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Fernández, F. G. A., Alarcón, F. J., & Parati, K. (2022). Hydrolyzed microalgae from biorefinery as a potential functional ingredient in Siberian sturgeon (A. baerii Brandt) aquafeed. *Algal Research*, *62*, 102592. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102592

Canelli, G., Tarnutzer, C., Carpine, R., Neutsch, L., Bolten, C. J., Dionisi, F., & Mathys, A. (2020). Biochemical and Nutritional Evaluation of Chlorella and Auxenochlorella Biomasses Relevant for Food Application. *Frontiers in Nutrition*, *7*. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.565996

Carneiro, W. F., Castro, T. F. D., Orlando, T. M., Meurer, F., Paula, D. A. de J., Virote, B. do C. R., Vianna, A. R. da C. B., & Murgas, L. D. S. (2020). Replacing fish meal by Chlorella sp. meal: Effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters and digestive enzymes. *Aquaculture*, *528*, 735612. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735612

Changing Markets Foundation, & Compassion in World Farming. (2019). *Until the seas run dry - How industrial aquaculture is plundering the oceans*. https://www.ciwf.org.uk/media/7436097/until-the-seas-dry.pdf

Choi, T.-Y., Choi, T.-I., Lee, Y.-R., Choe, S.-K., & Kim, C.-H. (2021). Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine*, *53*(3), 1–8. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00571-5

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*. https://doi.org/10.30802/aalas-jaalas-18-000045

Darwish, R. M., Kieran James Magee, Gedi, M. A., Ardeshir Farmanfarmaian, Zaky, A. S., Young, I., & Gray, D. A. (2023a). Evaluation of Chlamydomonas reinhardtii Microalgae as a Sustainable Feed Supplement and Fishmeal Substitute in Aquaculture with a Positive Impact on Human Nutrition. *Fermentation*, *9*(7), 682–682. https://doi.org/10.3390/fermentation9070682

Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*, *10*(8), 1153. https://doi.org/10.3390/biom10081153

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. *Nature*, *168*(4265), 167–167. https://doi.org/10.1038/168167a0

Esmail, M. Y., Astrofsky, K. M., Lawrence, C., & Serluca, F. C. (2015). The Biology and Management of the Zebrafish. *Laboratory Animal Medicine*, 1015–1062. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409527-4.00020-1

Fowler, L. A., Williams, M. B., D'Abramo, L. R., & Watts, S. A. (2020a). Zebrafish Nutrition—Moving Forward. *The Zebrafish in Biomedical Research*, 379–401. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812431-4.00033-6

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. https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1742

Gadzama, I. U., Ray, S., Méité, R., Mugweru, I. M., Gondo, T., Rahman, M. A., Redoy, A., Rohani, M. F., Kholif, A. E., Salahuddin, M., & Brito, A. F. (2025). Chlorella vulgaris as a Livestock Supplement and Animal Feed: A Comprehensive Review. *Animals*, *15*(6), 879–879. https://doi.org/10.3390/ani15060879

Gao, S., Chen, W., Cao, S., Sun, P., & Gao, X. (2024). Microalgae as fishmeal alternatives in aquaculture: current status, existing problems, and possible solutions. *Environmental Science and Pollution Research*. https://doi.org/10.1007/s11356-024-32143-1

Ghamkhar, R., & Hicks, A. (2020). Comparative environmental impact assessment of aquafeed production: Sustainability implications of forage fish meal and oil free diets. *Resources, Conservation and Recycling*, *161*, 104849. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.104849

Pascon, G., Messina, M., Petit, L., Valente, L., Oliveira, B., Przybyla, C., Dutto, G., & Tulli, F. (2021). Potential application and beneficial effects of a marine microalgal biomass produced in a high-rate algal pond (HRAP) in diets of European sea bass, Dicentrarchus labrax. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(44), 62185–62199. https://doi.org/10.1007/s11356-021-14927-x

Grubišić, M., Peremin, I., Djedović, E., Božidar Šantek, & Mirela Ivančić Šantek. (2024). Cultivation of a Novel Strain of Chlorella vulgaris S2 under Phototrophic, Mixotrophic, and Heterotrophic Conditions, and Effects on Biomass Growth and Composition. *Fermentation*, *10*(6), 270–270. https://doi.org/10.3390/fermentation10060270

Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, *50*(3), 346–363. https://doi.org/10.1002/bimj.200810425

Ibrahim, T. N. B. T., Feisal, N. A. S., Kamaludin, N. H., Cheah, W. Y., How, V., Bhatnagar, A., Ma, Z., & Show, P. L. (2023). Biological active metabolites from microalgae for healthcare and pharmaceutical industries: A comprehensive review. *Bioresource Technology*, *372*, 128661. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128661

Jacob-Lopes, E., Manzoni Maroneze, M., Queiroz, M. I., & Queiroz Zepka, L. (2020). *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds* (pp. 31–36). Academic Press. https://www.researchgate.net/profile/Alfredo-Martinez-Roldan/publication/343188113_Wastewater_treatment_based_in_microalgae/links/5f52923d92851c250b9241b8/Wastewater-treatment-based-in-microalgae.pdf

Jia, P. P., Liu, X. R., Wu, M. F., Li, Y., Zhang, L. C., & Pei, D. S. (2024). Generation, Maintenance, and Identification of Germ-Free Zebrafish Models from Larvae to Juvenile Stages. *Journal of Visualized Experiments*, *206*. https://doi.org/10.3791/66512

Kay M, Elkin L, Higgins J, Wobbrock J (2025). *ARTool: Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial ANOVAs.* doi:10.5281/zenodo.594511. https://doi.org/10.5281/zenodo.594511. R package version 0.11.2, https://github.com/mjskay/ARTool.

Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2020*(4), pdb.prot102269. https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269

Krause, J., Hartmann, N., & Pritchard, V. L. (1999). The influence of nutritional state on shoal choice in zebrafish,Danio rerio. *Animal Behaviour*, *57*(4), 771–775. https://doi.org/10.1006/anbe.1998.1010

Krone, P. H., Evans, T. G., & Blechinger, S. R. (2003). Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *14*(5), 267–274. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.09.018

Lawrence, C., Best, J., James, A., & Maloney, K. (2012). The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (Danio rerio). *Aquaculture*, *368-369*, 103–108. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.022

Lenth, R. V., & Piaskowski, J. (2026). *emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means*. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.emmeans.

Lenth, R. V., & Piaskowski, J. (2026). *emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means*. https://doi.org/10.32614/CRAN.package.emmeans

Licitra, R., Fronte, B., Verri, T., Marchese, M., Sangiacomo, C., & Filippo Maria Santorelli. (2024). Zebrafish Feed Intake: A Systematic Review for Standardizing Feeding Management in Laboratory Conditions. *Biology*, *13*(4), 209–209. https://doi.org/10.3390/biology13040209

Lv, J.-M., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., & Chen, H.-L. (2010). Enhanced lipid production of Chlorella vulgaris by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, *101*(17), 6797–6804. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.120

Marcillo, F. (2017). Shrimp farming and the environment in ecuador: Past and present. *World Aquaculture*, 39–42. https://www.researchgate.net/publication/360611797_Shrimp_Farming_and_the_Environment_in_Ecuador_Past_and_Present

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, *339*(1), 69–72. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001

Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. P. (2021). Supplementing wastewater with NPK fertilizer as a cheap source of nutrients in cultivating live food (Chlorella vulgaris). *Annals of Microbiology*, *71*(1). https://doi.org/10.1186/s13213-020-01618-0

Nagappan, S., Das, P., AbdulQuadir, M., Thaher, M., Khan, S., Mahata, C., Al-Jabri, H., Vatland, A. K. & Kumar, G. (2021). Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *Journal of Biotechnology*, *341*, 1–20. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.003

Nawaz, T., Saud, S., Gu, L., Khan, I., Shah Fahad, & Zhou, R. (2024). Cyanobacteria: Harnessing the Power of Microorganisms for Plant Growth Promotion, Stress Alleviation, and Phytoremediation in the Era of Sustainable Agriculture. *Plant Stress*, *11*, 100399–100399. https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100399

Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., Little, D. C., Lubchenco, J., Shumway, S. E., & Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, *591*(7851), 551–563.

O'Brine, T. M., Vrtělová, J., Snellgrove, D. L., Davies, S. J., & Sloman, K. A. (2015). Growth, Oxygen Consumption, and Behavioral Responses of Danio rerio to Variation in Dietary

Protein and Lipid Levels. *Zebrafish*, *12*(4), 296–304. https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1008

Odhiambo, F., Manyala, J., a, M., Museve, E., & Otieno, H. (2022). Formulating cost-effective Black Soldier fly (Hermetia illucens) based Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) diet for sustainable food security. *Fundamental and Applied Agriculture*, *7*(4), 268. https://doi.org/10.5455/faa.109168

Tham, P. E., Lim, H. R., Khoo, K. S., Chew, K. W., Yap, Y. J., Halimatul Munawaroh, H. S., Ma, Z., Rajendran, S., Gnanasekaran, L., & Lim, H. R. (2023). Insights of microalgae-based aquaculture feed: A review on circular bioeconomy and perspectives. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 103186–103186. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103186

Poh, Z. L., Amalina Kadir, W. N., Lam, M. K., Uemura, Y., Suparmaniam, U., Lim, J. W., Show, P. L., & Lee, K. T. (2020). The effect of stress environment towards lipid accumulation in microalgae after harvesting. *Renewable Energy*, *154*, 1083–1091. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.03.081

R Core Team. (2026). R: A language and environment for statistical computing. In *R Foundation for Statistical Computing*. https://doi.org/10.32614/R.manuals

Rapatsa, M., & Moyo, N. (2022). A Review and Meta-analysis of the Effects of Replacing Fishmeal with Insect Meals on Growth of Tilapias and Sharptooth Catfish. *Aquaculture Nutrition*, *2022*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2022/9367587

Rasool, I., Jain, K. K., Sahu, N. P., Sahoo, S., Gora, A. H., Rehman, S., & Dar, S. A. (2018). Evaluation of dietary protein to carbohydrate ratio on the growth, conversion efficiencies and body composition of Zebrafish. *Journal of Entomology and Zoology Studies*.

https://www.academia.edu/96013507/Evaluation_of_dietary_protein_to_carbohydrate_ratio_on_the_growth_conversion_efficiencies_and_body_composition_of_Zebrafish

Salmaso, N., & Tolotti, M. (2009). Other Phytoflagellates and Groups of Lesser Importance. *Encyclopedia of Inland Waters*, 174–183. https://doi.org/10.1016/b978-012370626-3.00137-x

Santigosa, E., Brambilla, F., & Milanese, L. (2021). Microalgae Oil as an Effective Alternative Source of EPA and DHA for Gilthead Seabream (Sparus aurata) Aquaculture. *Animals*, *11*(4), 971. https://doi.org/10.3390/ani11040971

Schneider, A. C. R., Machado, A. B. M. P., de Assis, A. M., Hermes, D. M., Schaefer, P. G., Guizzo, R., Fracasso, L. B., de-Paris, F., Meurer, F., Barth, A. L., & da Silveira, T. R. (2014). Effects of *Lactobacillus Rhamnosus* GG on Hepatic and Serum Lipid Profiles in Zebrafish Exposed to Ethanol. *Zebrafish*, *11*(4), 371–378. https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0968

Sheath, R. G., & Wehr, J. D. (2003). INTRODUCTION TO FRESHWATER ALGAE. *Freshwater Algae of North America*, 1–9. https://doi.org/10.1016/b978-012741550-5/50002-7

Texas Tech University. (2024). *Static Zebrafish Husbandry* (No. 040). Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). https://www.depts.ttu.edu/iacuc/SOP/SOP040_Zebrafish_Husbandry.pdf

Thomas, M., & van der Poel, A. F. B. (2020). Fundamental factors in feed manufacturing: Towards a unifying conditioning/pelleting framework. *Animal Feed Science and Technology*, *268*, 114612. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114612

Tibbetts, S. M., Mann, J., & Dumas, A. (2017). Apparent digestibility of nutrients, energy, essential amino acids and fatty acids of juvenile Atlantic salmon (Salmo salar L.) diets containing whole-cell or cell-ruptured Chlorella vulgaris meals at five dietary inclusion levels. *Aquaculture*, *481*, 25–39. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.018

Truzzi, C., Girolametti, F., Annibaldi, A., Zarantoniello, M., Olivotto, I., Riolo, P., Tulli, F., & Illuminati, S. (2023). Insect-based aquafeeds modulate the fatty acid profile of zebrafish: A comparison on the different life stages. *Animal Feed Science and Technology*, *305*, 115761. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115761

Truzzi, C., Girolametti, F., Giovannini, L., Olivotto, I., Zarantoniello, M., Scarponi, G., Annibaldi, A., & Illuminati, S. (2022). New Eco-Sustainable Feed in Aquaculture: Influence of Insect-Based Diets on the Content of Potentially Toxic Elements in the Experimental Model Zebrafish (Danio rerio). *Molecules*, *27*(3), 818. https://doi.org/10.3390/molecules27030818

University of Oregon. (2019). *ZFIN Zebrafish Developmental Stages*. Zfin. https://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/

Valente, L. M. P., Custódio, M., Batista, S., Fernandes, H., & Kiron, V. (2019). Defatted microalgae (Nannochloropsis sp.) from biorefinery as a potential feed protein source to replace fishmeal in European sea bass diets. *Fish Physiology and Biochemistry*, *45*(3), 1067–1081. https://doi.org/10.1007/s10695-019-00621-w

Valentine, S., & Kwasek, K. (2022). Feeding Rate and Protein Quality Differentially Affect Growth and Feeding Efficiency Response Variables of Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. https://doi.org/10.1089/zeb.2022.0002

Vasileios, B., Azimonti, G., de Lourdes Bastos, M., Christensen, H., Dusemund, B., Fašmon Durjava, M., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R. E., Woutersen, R., Finizio, A., Teodorovic, I., & Aquilina, G. (2022). Safety and efficacy of a feed additive consisting of ethoxyquin (6-ethoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline) for all animal species (FEFANA asbl). *EFSA Journal*, *20*(3). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7166

Vijayaram, S., Sun, Y.-Z., Zuorro, A., Ghafarifarsani, H., Van Doan, H., & Hoseinifar, S. H. (2022). Bioactive immunostimulants as health-promoting feed additives in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, *130*, 294–308. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.011

Vimalraj, S., Yuvashree, R., Hariprabu, G., Subramanian, R., Murali, P., Veeraiyan, D. N., & Thangavelu, L. (2021). Zebrafish as a potential biomaterial testing platform for bone tissue engineering application: A special note on chitosan based bioactive materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, *175*, 379–395. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.005

Watts, S. A., Powell, M., & D'Abramo, L. R. (2012). Fundamental Approaches to the Study of Zebrafi sh Nutrition. *ILAR Journal*, *53*(2), 144–160. https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.144

Widjaja, A., Chien, C.-C., & Ju, Y.-H. (2009). Study of increasing lipid production from freshwater microalgae Chlorella vulgaris. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *40*(1), 13–20. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2008.07.007

Wynn, J., Behrens, P., Sundararajan, A., Hansen, J., & Apt, K. (2010). Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates. *Single Cell Oils*, 115–129. https://doi.org/10.1016/b978-1-893997-73-8.50010-4

Zlaugotne, B., Pubule, J., & Blumberga, D. (2022). Advantages and disadvantages of using more sustainable ingredients in fish feed. *Heliyon*, *8*(9), e10527. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10527