



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

Dieta enriquecida con Nannochloropsis limnetica para juveniles de tilapia (Oreochromis niloticus)

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:
Francisco Javier Guiscafré Rodea

Dirigido por:
Dr. Juan Fernando García Trejo

Dr. Juan Fernando García Trejo
Presidente



Firma

Dr. Enrique Rico García
Secretario



Firma

Dr. Ramon Gerardo Guevara González
Vocal



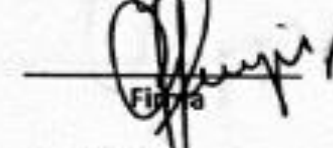
Firma

Dra. Rosario Guzmán Cruz
Suplente



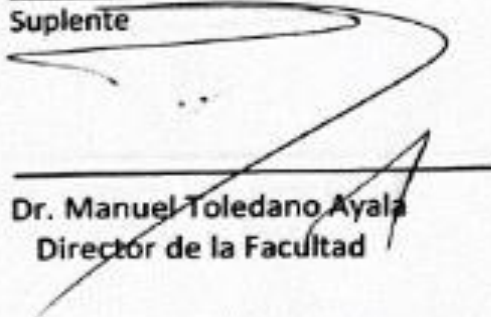
Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Suplente



Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad



Goana
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Fecha (Abril 2018)

RESUMEN

La tilapia es un pez de gran importancia económica ya que es el 3ro más cultivado en el mundo. Para su cultivo se manejan alimentos comerciales en los que en su formulación se incluyen harinas de pescado que les proveen todo lo necesario para su crecimiento, pero debido a una alta demanda, sobrepesca y baja calidad, sus costos se han ido incrementando por lo que es necesario la búsqueda de proteínas alternativas de mejor costo que sustituyan y mejoren la calidad de la tilapia. Ya que es un pez omnívoro que en la naturaleza se alimenta de principalmente de proteína vegetal en sus primeras etapas de desarrollo, se buscó en la presente investigación, substituir la proteína proveniente de harinas de pescado, por proteínas de alta calidad como son las contenidas en la microalga *Nannochloropsis limnetica*. La primera parte de la investigación se centró en cultivar esta microalga en calidad y cantidad suficiente para enriquecer un alimento comercial para etapa de juvenil de la marca purina en una proporción de 5, 10 y 15%, constatándose que cubre todos los requerimientos nutricionales para la alimentación de *Oreochromis niloticus*. Como control se utilizó el alimento comercial. Los cuatro tratamientos fueron probados por 60 días por triplicado en un sistema cerrado con recirculación bajo condiciones controladas, evaluándose el crecimiento y asimilación del alimento. Se pudo comprobar que la microalga *N. limnetica* puede remplazar hasta en un 15% un alimento comercial de alta calidad elaborado a base harina de pescado no encontrándose una diferencia significativa en su crecimiento, supervivencia y asimilación.

(Palabras clave: tilapia, *Nannochloropsis limnetica*, dieta enriquecida, microalga)

SUMMARY

The Tilapia is a fish of great economic importance since it is the 3rd most cultivated in the world. For its cultivation the commercial feeds include in their formulation fishmeal that provides them with everything necessary for their growth, but due to its high demand, overfishing, and low quality, their costs have been increasing so it is necessary to search for alternative proteins of better cost that replace and improve the quality of the tilapia. Since it is an omnivorous fish that feeds mainly on vegetable protein in its early stages of development, it was looked for in the present study, to replace protein obtained from fishmeal, by high quality proteins, such as those contained in the microalga *Nannochloropsis limnetica*. The first part of the research focused on cultivating this microalga in sufficient quality and quantity to enrich a commercial food for juvenile stage of a purine brand in a proportion of 5, 10 and 15%, confirming that it covers all the nutritional requirements for feeding *Oreochromis niloticus*. As control, the commercial feed was used. The four treatments were tested for 60 days in triplicate in a closed system with recirculation under controlled conditions, evaluating the growth and assimilation of the food. It was possible to verify that the microalga *N. limnetica* can replace up to 15% of a commercial food of high quality elaborated with fishmeal, not finding a significant difference in its growth, survival and assimilation.

(Key words: tilapia, *Nannochloropsis limnetica*, enriched diet, microalgae)

DEDICATORIA

Quiero agradecer principalmente a Dios que sin él no soy nada. A la Virgencita hermosa que me cuida a cada momento. A mi gordita querida que me ha apoyado a lo largo del camino y me sigue en mis ideas locas. A mis peques que son la razón por la cual quiero mejorar cada día y a la Universidad autónoma de Querétaro con sus profesores por todo el conocimiento que me compartieron y el apoyo en el desarrollo del proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer el financiamiento de la Universidad Autónoma de Querétaro de manera muy especial del Dr. Juan Fernando García Trejo por su apoyo en la investigación. La empresa Finca Ahuehuetes que presto sus instalaciones para la producción de la microalga y el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada que me hizo posible culminar mis estudios.

En la preparación de este manual se recogieron las opiniones desinteresadas de los Directores y Coordinadores de Investigación y Posgrado de todas las Facultades de la Universidad Autónoma de Querétaro, así como de investigadores, académicos y personal administrativo de la misma. En particular, la Dirección de Servicios Escolares y la Dirección de Investigación y Posgrado.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
SUMMARY	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
TABLA DE CONTENIDOS.....	6
INDICE DE FIGURAS.....	8
INDICE DE CUADROS.....	9
INDICE DE GRÁFICAS	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Antecedentes.....	13
2.1.1 Fuentes alternativas de proteína a la harina de pescado en la historia	13
2.1.2 Uso de microalgas en la acuicultura.....	13
2.1.3 Uso de microalgas en tilapia.....	14
2.2 Fundamentación teórica.	15
2.2.1 Requerimientos Nutricionales Tilapia.....	17
2.2.2 Microalga <i>Nannochloropsis limnetica</i>	20
3. Hipótesis	23
4. Objetivo General.....	23
4.1 Objetivos específicos	23
5. Materiales y métodos.....	24
5.1 Cultivo y cosecha de la microalga en agua residual de invernadero.	24
5.2 Dietas.....	27
5.3 Validación de la dieta.	29
5.4 Normatividad.....	31
6. Resultados y discusión.....	32
6.1 Cultivo y cosecha de la microalga en agua residual de invernadero.	32
6.2 Dietas.....	41
6.3 Validación de la dieta.	42
6.5 Costos.....	46
6.6 Resumen de resultados y discusión.	51

7. Conclusiones.....	52
8. Bibliografía.....	53

INDICE DE FIGURAS

Ilustración 1 Peceras de acrílico donde se acomodaron los alevines de tilapia.	29
Ilustración 2 Fotobiorreactor tubular cerrado de 60L.....	38
Ilustración 3 Fotobiorreactores de 600L donde se cultivó la microalga <i>Nannochloropsis limnetica</i>	39
Ilustración 4 Microalga <i>Nannochloropsis limnetica</i> al ser centrifugada (izquierda) y congelada (derecha).	40
Ilustración 5 Microalga después de ser secada en horno a 40°C y lista para ser utilizada como alimento para tilapia.	40

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Tallas y pesos estimados para cada etapa de vida de la tilapia.....	15
Cuadro 2 Requerimientos de aminoácidos para la etapa de juvenil de la tilapia.	17
Cuadro 3 Principales constituyentes por 100g	19
Cuadro 4 Vitaminas por 100g	19
Cuadro 5 Perfil de aminoácidos.	20
Cuadro 6 Tallas y pesos estimados para cada etapa de vida de la tilapia.....	27
Cuadro 7 Concentración y proporción N:P de NO ₃ ⁻ y PO ₄ ³⁻ en el medio BG11 y en el agua residual de invernadero de cultivo de jitomate.....	33
Cuadro 8 Valores máximos, mínimos y más frecuente, de nutrientes encontrados en las aguas residuales de producción hortícola de invernadero del 2012 al 2016.	34
Cuadro 9 Medios preparados para evaluar si la microalga <i>N. limnetica</i> puede crecer en las variaciones de nutrientes existentes en el agua residual del invernadero del cultivo de jitomate.	34
Cuadro 10 Tasas de crecimiento y tiempo de duplicación para la microalga <i>N. limnetica</i> a tres concentraciones diferentes en agua residual de invernadero de producción de jitomate.....	35
Cuadro 11 Bromatológicos del alimento control de Purina y de la Microalga <i>N. limnetica</i>	40
Cuadro 12 Dietas finales respecto a los requerimientos nutricionales de la tilapia.....	40
Cuadro 13 Crecimiento promedio y asimilación del alimento para <i>Oreochromis niloticus</i> alimentada con las dietas experimentales.....	41
Cuadro 14 Aminoácidos requeridos para la tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> VS los aminoácidos proporcionados en <i>N. Limnetica</i>	44
Cuadro 15 Formulación de dos dietas elaboradas a partir de harina de pescado la primera y harina de microalga la segunda.	46
Cuadro 16 Comparación de costos en pesos mexicanos de un alimento para el estadio juvenil con y sin la microalga <i>N. limnetica</i>	47

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Tendencia de crecimiento de la microalga <i>Nannochloropsis limnetica</i> cultivada en dos medios: Agua residual de invernadero de producción hortícola y en un medio comercial BG11.	33
Gráfica 2 Crecimiento en el tiempo de la microalga <i>N. limnetica</i> en tres concentraciones diferentes de agua residual de invernadero de producción de jitomate.	37
Gráfica 3 Tendencia de crecimiento en g para las dieta control y las dietas enriquecidas con microalga al 5%, 10% y 15% en el tiempo.....	43
Gráfica 4 Tendencia de crecimiento en la longitud patrón para las dieta control y las dietas enriquecidas con microalga al 5%, 10% y 15% en el tiempo.....	44
Gráfica 5 Tendencia de crecimiento en la altura máxima para las dieta control y las dietas enriquecidas con microalga al 5%, 10% y 15% en el tiempo.....	44
Gráfica 6 Precio mensual de la harina de pescado-Peso Mexicano por tonelada.	49

1. Introducción

La tilapia es una importante fuente de proteína animal y de ingresos en el mundo (Sosa *et al.*, 2005) siendo uno de los cultivos de pez más ampliamente distribuidos a nivel mundial; es una alternativa ventajosa para la producción de proteína sana y barata debido a sus altos rendimientos, crecimiento mayor que el de otras especies en sistemas de cultivo intensivo, excelente calidad de carne y por lo tanto buena aceptación en los mercados. Actualmente, la producción en granja representa más del 75% de la producción a nivel mundial y está en aumento, de 1970-2000 se incrementó en un promedio de 13.9% anual (FAO, 2003; FAO, 2009), esto se puede atribuir a su tolerancia a factores de estrés impuestos por las prácticas rutinarias de acuicultura, comerciabilidad y habilidad en utilizar nutrientes de una gran variedad de fuentes (Fasakin *et al.*, 1999). Sin embargo la creciente demanda ha dado como resultado una disminución en la captura de peces silvestres y un aumento en los costos.

Una de las tareas fundamentales en la acuicultura intensiva y semi-intensiva, consiste en disminuir el costo del alimento artificial, ya que este representa casi el 60% del costo total en esta rama (Toledo *et al.*, 1986). La economía en un sistema de piscicultura intensiva depende en gran parte del costo de la ración necesaria para producir un Kg de peces comercial (Paiva *et al.*, 1991). Según Silva *et al.*, (1989), en algunos casos los alimentos pueden llegar a representar hasta el 85% del costo de la producción.

Otro de los principales problemas relacionados con la alimentación y nutrición de la tilapia, especialmente en Latinoamérica, es el déficit de alimentos artificiales de calidad a bajo costo, que puedan satisfacer las necesidades nutricionales de los peces de cultivo.

Debido a la falta de alimentos balanceados para peces en el mercado nacional, los productores enfrentan la disyuntiva de producir sus propios alimentos, ante lo cual también confrontan diversos problemas, como lo es la ausencia de empresas que elaboren harina de pescado con alto valor proteico necesario para poder preparar sus dietas (Silveira, 1993). Por lo que para evitar dependencia a la captura silvestre es necesario buscar alternativas sustentables con alto valor proteico. (Turchini *et*

al., 2009). También es importante considerar la calidad de la proteína de pescado, las grasas saludables, y bajos niveles de contaminantes para evitar problemas en la salud pública (Naylor *et al.*, 2009). Una de estas alternativas son las microalgas, ya que de manera natural la tilapia se alimenta de ella siendo su ausencia en los alimentos comerciales una de las razones de su baja calidad nutricional ya que como comenta Borowitzca (2006), las microalgas son una importante fuente de proteína y suplemento animal en la crianza comercial de muchos animales acuáticos.

La microalga *Nannochloropsis limnetica* es una microalga muy importante en acuicultura debido a su valor nutricional, pertenece a la clase Eustigmatophyceae, que además de su alto nivel proteico, agrupa a las especies que contienen la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), como son: ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA) y docosahexaenoico (DHA) de gran importancia en la nutrición de animales marinos, especialmente en el crecimiento y desarrollo de larvas de peces, moluscos y crustáceos (Otero *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1999).

El uso de *Nannochloropsis limnetica* para reemplazar alimentos con alto contenido de proteína todavía no ha sido explorados a gran escala (Markovits *et al.*, 1992), por lo que el presente trabajo busca evaluar el efecto de la microalga *Nannochloropsis limnetica* en el crecimiento y calidad de la Tilapia.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Antecedentes

Los acuicultores utilizan principalmente harina de pescado porque provee toda la demanda nutricional que requieren los peces para su desarrollo como son aminoácidos, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales. Sin embargo, el incremento en la demanda, el incremento en los costos, baja calidad, contaminación con metales pesados y un suministro inestable de la harina con el progreso actual del cultivo, hacen necesario buscar fuentes alternativas de proteína. (Gatlin, et al., 2007).

2.1.1 Fuentes alternativas de proteína a la harina de pescado en la historia

Se han llevado a cabo estudios con harinas de soja usada en alimento para peces omnívoros con buenos resultados según lo revisado por Gatlin (2003), Drew et al., (2007) y Sorensen et al., (2009). También se han realizado varias investigaciones para examinar el potencial de otras plantas en dietas para tilapia como ingrediente o como sustituto completo de la harina de pescado, como es el caso de: harina de gluten de maíz, guisante, semilla de algodón, semilla de girasol, harina de plumas, harina de subproductos de aves de corral, harina de sangre entre otros (El-Sayed, 1999; Gatlin et al., 2007; Mbahinzireki et al., 2001; El-Saidy y Gaber, 2003; Borgerson et al., 2006; Goda et al., 2007; Gonzalez et al., 2007; Schultz et al., 2007; Nguyen et al., 2009; Hernández et al., 2010). De los recién mencionados las investigaciones realizadas por Borgerson et al. (2006); Gonzalez et al. (2007) y Nguyen et al. (2009), fueron probadas de manera particular en tilapia del Nilo.

2.1.2 Uso de microalgas en la acuicultura.

En contraste con plantas terrestres hay poca información en relación al uso de microalgas como sustituto de harina de pescado. Algunos autores, como es el caso de Ogunji (2004), han utilizado proteínas de microalga en las dietas de peces, ya que se ha visto que incluyendo los peces carnívoros pueden ingerir algas como parte de su alimentación (Nandeesha *et al.*, 1998), principalmente debido a que contienen un alto nivel de proteína (Borowitzka, 2006), razón por lo cual, aunque la producción de microalgas en el mundo es baja debido a sus altos costos de producción, de la que se produce más del 30% a nivel mundial se vende para

alimento animal y más del 50% de la producción mundial de spirulina es usada como suplemento alimenticio. (Spolaore et al., 2006). Las especies comerciales más usadas en la acuicultura són: *Chlorella*, *Spirulina*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira* (Yamaguchi, 1997; Apt, 1999; Muller, 2000, Borowitzka 1997). Por otro lado, mejoras en el crecimiento, utilización del alimento, metabolismo lipídico, actividad fisiológica, respuesta a stress, resistencia a enfermedades y calidad en la carne han sido reportadas con niveles de inclusión de 1-5% en dietas con alga (Mustafa y Nakagawa, 1995; Nakagawa y Montgomery, 2007); por lo tanto usar microalgas en dietas de pescado puede resultar en un mejor uso de dietas artificiales en cultivos de peces y mejorar la salud del pescado (Mustafa y Nakagawa, 1995).

2.1.3 Uso de microalgas en tilapia

La mayoría de los estudios de fitoplancton en tilapia se han concentrado en describir las preferencias en la dieta. (Moriarty y Moriarty, 1973; Spataru y Zorn, 1978; Gophen, 1980; Bowen, 1982; Gophen *et al.*, 1983). Ha habido algunos estudios cuantitativos en tilapia que se alimentan filtrando fitoplancton, pero la mayoría de ellos han sido enfocados en la tilapia adulta. (Caulton, 1982; Dempster *et al.*, 1995; McDonald, 1985; Robinson *et al.*, 1995; Northcott *et al.*, 1991). Sin embargo, hay pocos datos concernientes al efecto del fitoplancton sobre la tilapia en etapa juvenil. Falta mucho por determinarse en como la ingestión y asimilación del fitoplancton afecta el desarrollo de la tilapia larval y de diferentes especies de alga.

Es muy importante mencionar que en la naturaleza la tilapia es conocida por cambiar su dieta y alimentación de carnívoro a omnívoro cuando alcanza un tamaño de 2-3 cm, y cambia de nuevo para alimentarse de fitoplancton cuando alcanza los 6 a 7 cm en estado natural. En la etapa adulta las algas verdes cuentan como parte importante en su dieta., mientras que se alimentan de principalmente pequeños invertebrados durante su etapa larval y juvenil (Fry y Iles, 1972; Moriarty y Moriarty, 1973; Yada, 1982; Getachew, 1987; McDonald, 1987). Por lo tanto hay una etapa de transición en su alimentación en su hábitat natural. El cambio en la dieta con su

tamaño corporal puede deberse a los cambios de desarrollo en la habilidad de la tilapia de capturar y procesar el fitoplancton con el incremento en el número de celular en el moco bucofaríngeo y su actividad así como un mayor desarrollo del tracto digestivo. Estudios en el desarrollo de la morfología del tracto digestivo mostraron que la tilapia larval tiene un sistema digestivo similar al de la tilapia adulta. (Bowen, 1982; Drenner *et al.*, 1984; Northcott y Beveridge, 1988; Sanderson *et al.*, 1996; Beveridge y Baird, 2000)

En resumen aunque en su medio ambiente las microalgas son una fuente importante de proteína para la tilapia, las dietas comerciales no lo incluyen ya que hasta hace solo recientemente se han empezado a producir de manera controlada y no hay mucha información al respecto. De allí la importancia de esta tesis, ya que puede probar el efecto benéfico de una microalga como complemento en la dieta de la tilapia.

2.2 Fundamentación teórica.

La tilapia es un pez teleósteo, del orden Perciforme perteneciente a la familia Cichlidae. Originario de África, actualmente se cultivan con éxito unas 10 especies siendo *Oreochromis aureus*, *O. niloticus* y *O. mossambicus* las más cultivadas. Son peces endémicos de África, con un rango muy amplio de adaptabilidad a diferentes tipos de agua lo que la hace ideal para la piscicultura. Se han descrito más de 70 especies (muchas con características morfológicas crípticas) y alrededor de 100 subespecies, agrupadas en la familia Cichlidae en 4 géneros, principalmente por sus hábitos reproductivos y dentición (dientes faríngeos): *Oreochromis*, *Tilapia*, *Sarotherodon*, *Danakilia*, *Tristamella* y *Pelmatochromis*.

Las principales especies del género *Oreochromis* son: *O. niloticus* (variedades *stirling*, *egipcia*, *tailandesa*, *GIFT*, *chitralada*, líneas: gris y roja.), *O. aureus* (líneas: gris, roja, azul, blanca (*Rocky Mountain Bloom*) y *O. mossambicus* (líneas: gris, roja, anaranjada).

O. niloticus, (línea *egipcia*) es gris con tonalidades verde metálico y bandas verticales de color negro, siendo más notorias en la aleta caudal.

Presenta 5 etapas en su desarrollo, huevo, alevín, cría, juvenil y adulto (Basualdo *et al.*, 2012). (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tallas y pesos estimados para cada etapa de vida de la tilapia

Estadio	Talla (cm)	Peso (g)	Tiempo (días)
Huevo	0.2-0.3	0.01	3-8
Alevín	0.7-1.0	0.1-0.12	10-15
Cría	1-5	0.5-4.7	15-30
Juvenil	5-10	10-50	45-60
Adulto	10-18	70-100	70-90

Sin embargo cabe mencionar que los datos encontrados en la Tabla 1 varían dependiendo el autor. Es decir, algunos autores no manejan la etapa de cría, extendiendo la etapa de alevín hasta los 5 g (Olvera, *et al.*, 1998), y otros autores también eliminan la etapa de cría, pero manejan la etapa de juvenil desde los 0.12 g (El-Sayed, *et al.*, 2013). Para fines prácticos en la presente investigación, la etapa de cría se eliminó, siendo abarcada por el estadio de juvenil considerándose de 0.5 a 50g. Habita en una gran diversidad de cuerpos de agua; como son arroyos, ríos, lagos, lagunas y lagunas costeras, incluso en hábitats marinos, muestran una gran preferencia por aguas de escasa corriente o lénticas, poca profundidad y cerca de las orillas, refugiándose en márgenes de pantanos y riberas entre las raíces de las plantas acuáticas y piedras. (Basualdo *et al.*, 2012). Puede tolerar un mayor rango de condiciones ambientales, incluyendo factores como salinidad, oxígeno disuelto, temperatura, pH, y niveles de amonio, que la mayoría de los peces que se cultivan en agua dulce. Por lo general, la tilapia es altamente tolerante a aguas salinas, también son altamente tolerantes a bajos niveles de oxígeno disuelto, inclusive por debajo de 0.1 mg/L (Magid y Babiker, 1975), pero su crecimiento óptimo se obtiene a concentraciones mayores a 3mg/L (Ross, 2000). La temperatura es un efecto metabólico importante, el crecimiento óptimo se encuentra entre los 22-29°C, el desove normalmente ocurre a temperaturas mayores a los 22°C. Por debajo de los

10°C es casi imposible que sobreviva y por debajo de los 20°C el crecimiento es mínimo, pero puede soportar temperaturas tan altas como los 42°C. (Sarig, 1969; Caulton, 1982; Mires, 1995). Otras características relevantes de la calidad del agua son el pH y los niveles de amonio. Por lo general la tilapia puede tolerar un rango de pH de 3.7 a 11, pero el mejor crecimiento se alcanza entre pH de 7 y 9 (Ross, 2000). El amonio es tóxico en la forma de amoníaco a concentraciones mayores a 7 mg/L (Redner y Stickney, 1979) y le causa disminución en el apetito y crecimiento a concentraciones tan bajas como 0.1 mg/L. La concentración óptima está estimada por debajo de .05 mg/L (El-Sherif *et al.*, 2008).

2.2.1 Requerimientos Nutricionales Tilapia.

En la naturaleza la tilapia se alimenta de una gran variedad de fuentes, que incluye fitoplancton, perifiton, zooplancton, larva de pez y detritus (Green, 2006), de manera particular es omnívora hasta su etapa de 5 cm. donde presenta preferencias fitoplanctofagas, puesto que su alimentación se basa en el consumo de zooplancton, insectos, vegetales acuáticos, y de alimentos artificiales como harinas y granos. Los juveniles se alimentan preferentemente de fitoplancton y zooplancton, inclusive aceptan alimentos preparados que se utilizan en la crianza de pollos. Los adultos comen plancton, algas filamentosas, algunas plantas superiores y detritus vegetal (Basualdo *et al.*, 2012).

2.2.1.1 Proteína

No tienen un requerimiento específico de proteína cruda, pero más bien necesitan una combinación de aminoácidos esenciales, por lo tanto el perfil de la dieta proteica es importante cuando se formula una dieta para tilapia. Las proteínas son usadas continuamente por el pez para su mantenimiento, crecimiento y funciones de reproducción. Cuando se da en exceso, la proteína puede ser usada como energía, sin embargo, no es recomendable por los costos elevados de esta. Los requerimientos proteicos de la tilapia disminuyen con el tiempo, para alevín requiere entre 30 y 56% y para juvenil requiere entre 30-40%, mientras que para adulto con 28-30% es suficiente (Winfrey y Stickney, 1981; Jauncey, 1983; Al Hafedh, 1999; Siddiqui *et al.*, 1988; Twibell y Brown, 1998).

Como otros peces de agua cálida la tilapia requiere de 10 aminoácidos esenciales que tienen que estar en su dieta (Tabla 2). Los aminoácidos esenciales pueden lograrse mediante el uso balanceado de proteína animal y vegetal, y en caso de ser necesario incluyendo aminoácidos sintéticos.

Cuadro 2. Requerimientos de aminoácidos para la etapa de juvenil de la tilapia

Parámetros	% del total de AA (analizado)
Arginina (Arg, R) *	1.81
Histidina (His, H) *	0.75
Isoleucina (Ile, I)	1.34
Leucina (Leu, L)	1.46
Lisina (Lys, K)	2.2
Metionina (Met, M)	0.75
Fenilalanina (Phe, F)	2.38
Treonina (Thr, T)	1.7
Triptófano (Trp, W)	0.43
Valina (Val, V)	1.2

2.2.1.2 Lípidos

Los lípidos en la dieta proveen una mayor fuente de energía facilitando la absorción de vitaminas solubles en grasa, juegan un importante rol en la estructura y función de la membrana, sirven como precursor para hormonas esteroideas y prostanglandinas y sirven como fuentes metabolizables de los ácidos grasos esenciales. Winfree y Stickney (1981) encontraron que para tilapia de hasta 2.5 g, el óptimo de lípidos en su dieta debe ser de 5.2%, disminuyendo a 4.4% cuando llegan a 7.5 g. Jauncey (2000) sugirió que, para maximizar la utilización de las proteínas, la concentración de grasas debe estar entre 8 y 12 % para tilapia de hasta 25g. y de 6-8% para peces adultos. Así como la mayoría de los peces, al parecer la tilapia también requiere ácidos grasos n-6 y en menor medida los n-3. Los lípidos en la dieta deberán suministrar por lo menos el 1% de los ácidos grasos n-6 (Teshima *et al.*, 1982). Cuando los lípidos en la dieta contengan una considerable cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, se deberá prestar atención para prevenir que se oxiden ya que se vuelven tóxicos, reducen la disponibilidad de otros nutrientes e impactan en la calidad de la carne de pescado.

2.2.1.3 Carbohidratos

Los peces no tienen requerimientos específicos para los carbohidratos, porque los precursores de aminoácidos y los ácidos grasos pueden suministrar la glucosa requerida por la vía del gluconeogénesis. Esto no implica que los carbohidratos no deban ser incluidos en la dieta de la tilapia, sin embargo, los carbohidratos proveen una relativamente económica fuente de energía comparada con la proteína, y su inclusión puede mejorar la calidad de alimentos peletizados. La tilapia puede efectivamente utilizar niveles de carbohidratos hasta 30-40% en la dieta, lo que es considerablemente mayor que la mayoría de los peces cultivados (Anderson *et al.*, 1984; Teshima *et al.*, 1985). La fibra es usualmente considerada incomedible, ya que la tilapia no posee las enzimas que se requieren para digerirla (Saha *et al.*, 2006). Por esta razón, y para obtener un crecimiento máximo los niveles de fibra cruda en dieta de tilapia no deben exceder el 5% (Anderson *et al.*, 1984). La relación entre concentraciones de proteínas en la dieta y energía es muy importante en la nutrición de los pescados. Las dietas deben estar balanceadas para maximizar el uso de la proteína para el crecimiento al proveer cantidades óptimas de energía así como carbohidratos y lípidos (Winfrey y Stickney, 1981; Shiau y Huang, 1990).

2.2.1.4 Vitaminas y minerales

Las vitaminas y minerales son esenciales para el metabolismo normal del pez. Una suplementación de vitaminas y minerales en la forma de premezclas pueden ser benéficas en sistemas intensivos, a pesar de que la mayoría de estos requerimientos son usualmente alcanzados de manera natural en cultivos de estanques extensivos y semi-intensivos. Sin embargo, nos son muy conocidos los requerimientos de todas las vitaminas, por esto mismo es muy difícil hacer recomendaciones generales de la concentración óptima, pero niveles mínimos generales son comúnmente aplicados a los alimentos. Son necesarios conocimientos básicos de toxicidad mineral y la interacción entre los minerales cuando se elabora la suplementación. Cabe mencionar que suministros excesivos de algunos minerales pueden causar deficiencias en otros y en casos extremos pueden ocasionar toxicidad en los peces. (Lim *et al.*, 2000; Shiau y Hsieh 1997; Abdelghany 1996; Saleh *et al.*, 1995; Satoh *et al.*, 1987).}

2.2.2 Microalga *Nannochloropsis limnetica*

La microalga *Nannochloropsis limnetica*, es un microorganismo fotosintético eucariota con alta tasa de crecimiento. Presenta una forma esférica u ovalada con un tamaño de 1.5-6 X 2.5-6µm y es la única especie del genero *Nannochloropsis* de agua dulce descubierta en Alemania en 1998. Este género presenta la peculiaridad de contener un gran contenido de ácidos grasos poliinsaturados Omega 3 del tipo EPA. (Krienitz, *et al.*, 2000). Los ácidos grasos omega 3 y una alta proporción de n-3/n-6 han sido altamente reconocidos beneficiosos para la salud humana (Grimm *et al.*, 1994; Ruxton *et al.*, 2004; Tacon y Metian 2013). En particular el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) han demostrado un gran impacto en enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, funcionamiento cerebral y salud mental (Ruxton *et al.*, 2004).

Con base a una ficha técnica proporcionada por la empresa Ecoduna en Austria el contenido de la microalga *Nannochloropsis limnetica* es el siguiente:

Cuadro 3. Principales constituyentes por 100g

Parametros	Valores medios
Energía/Calorias	1621 kJ/388kcal
Grasas	9.9 g
<i>Acidos grasos saturados</i>	3.5 g
<i>Acidos grasos monosaturados</i>	4.2 g
<i>Acidos grasos polinsaturados</i>	7.6 g
Carbohidratos	5.9 g
<i>Azucares</i>	<0,5 g
Fibras	16,9 g
Proteina	35,2 g
Sodio (Cloruro de sodio)	3,2 g
Contenido de agua	6,1 g

Cuadro 4. Vitaminas por 100 g

Parametros	Valores medios
Acido ascórbico	<5,0 mg
Vitamina B12	24 µg
Vitamina K1	114 µg
Tocopherol, alpha	1,7 mg
Tocopherol, beta	0,25 mg
Tocopherol, gamma	<0,10 mg
Tocopherol, delta	<0,10 mg
Vitamina E	1,8 mg

Cuadro 5. Perfil de aminoácidos

Parametros	% del total de AA (analizado)
Esenciales	
Arginina (Arg, R) *	7.55
Histidina (His, H) *	1.33
Isoleucina (Ile, I)	3.28
Leucina (Leu, L)	9.83
Lisina (Lys, K)	6.98
Metionina (Met, M)	0.66
Fenilalanina (Phe, F)	5.32
Treonina (Thr, T)	4.04
Triptófano (Trp, W)	Ausencia
Valina (Val, V)	7.41
No esenciales	
Alanina (Ala, A)	10.49
Prolina (Pro, P)	5.27
Glicina (Gly, G)	7.08
Serina (Ser, S)	4.89
Ácido aspártico (Asp, D)	10.11
Ácido glutámico (Glu, E)	11.87
Glutamina (Gln, Q)	Ausencia
Tirosina (Tyr, Y)	3.37
Cisteína (Cys, C)	Ausencia
Asparagina (Asn, N)	Ausencia
Total	100

Ya que la microalga *Nannochloropsis limnetica* apenas fue descubierta en Alemania en 1998, se conoce poco de sus condiciones óptimas de crecimiento, sin embargo por la ubicación donde fue colectado (Krienitz *et al.*, 2000) y datos dados por el proveedor de la cepa las condiciones esperadas de crecimiento son:

- pH de 8.4
- Temperatura 25°C.
- 13 horas luz 11 oscuridad.
- NO₃ no se encontró información.
- PO₄ no se encontró información.

Por sus características se espera la microalga *Nannochloropsis limnetica*, pueda reemplazar o por lo menos complementar una dieta comercial a base de harina de pescado.

2.2.3 Consideraciones de la cepa.

Una microalga que se pretenda incluir en una dieta para pez tiene que cumplir con los siguientes criterios: Ser cultivadas fácilmente y no tóxicas. También deben tener el tamaño y forma correctos para ser ingeridas y tener una alta calidad nutricional. [Brown *et al.*, 1999; Renaud *et al.*, 2002]. Por lo que el contenido proteico es un factor mayor para determinar el valor nutricional de la microalga. Además, debe tener una buena concentración de ácidos grasos insaturados EPA, AA, DHA. (Reitan, 1997). En efecto, algunos ácidos grasos son esenciales para muchos animales marinos (Nichols, 2003) y requerimientos similares existen para el crecimiento y metamorfosis de muchas larvas [Becker, 2004; Aragão *et al.*, 2004]. Sin embargo, debe ser notado que las relaciones entre DHA, EPA y AA son más importantes que sus niveles absolutos (Apt y Behrens 1999). El contenido de vitaminas en las microalgas también tiene que ser tomado en cuenta ya que son sumamente importantes (Brown, 1999; Yamaguchi, 1997)

Cabe remarcar que la pared celular de las microalgas representa el 10% de la materia seca del alga, esto es un serio problema al digerir y utilizar la biomasa algal, ya que no es digestible para humanos y cualquier otro no rumiante. Por lo tanto, tratamientos adicionales son necesarios para romper la pared celular y hacer a la proteína y otros constituyentes accesibles para las enzimas digestivas. Muchos autores han estudiado el efecto de diferentes tratamientos postcosecha en la digestibilidad de varias especies de algas, demostrando la importancia del apropiado procesamiento de la biomasa algal (Becker, 2004).

3. Hipótesis

Una dieta enriquecida con la microalga *Nannochloropsis limnetica* permitirá mejorar el crecimiento, peso, supervivencia y calidad nutricional de los juveniles de tilapia.

4. Objetivo General

Elaborar una dieta enriquecida con la microalga *Nannochloropsis limnetica* que permita mejorar el crecimiento, peso, supervivencia y calidad nutricional de los juveniles de tilapia.

4.1 Objetivos específicos

Producir la microalga *Nannochloropsis limnetica* en suficiente cantidad y calidad para poder elaborar la dieta.

Realizar análisis bromatológicos a la microalga *Nannochloropsis limnetica* y al control Purina.

Elaborar las dietas balanceadas que cubra los requerimientos nutricionales de la tilapia.

Evaluar el efecto en el peso, crecimiento, supervivencia y asimilación en los juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) de una dieta complementada con la microalga *Nannochloropsis limnetica* a una concentración de 5%, 10 %y 15%.

5. Materiales y métodos

5.1 Cultivo y cosecha de la microalga en agua residual de invernadero.

5.1.1 Aclimatación de la microalga.

N. limnetica CCMP2260 fue adquirida del laboratorio Bigelow en el estado de Main, USA. Para su aclimatación, se inoculó en botellas Simax de 1 L con un diámetro de 10 cm, en medio BG11 de laboratorios Sigma, seleccionado como óptimo para el crecimiento de la microalga *N. limnetica* con base a la bibliografía (Yubin, et al., 2014). Medio y botellas fueron esterilizados en autoclave por 20 min a 121°C. La aireación de las botellas se realizó con material de acuario, como son, bombas de aire, válvulas, mangueras de silicón y difusores, todo el material también fue esterilizado en autoclave. Las botellas fueron colocadas dentro del laboratorio a una temperatura promedio de 21°C. La iluminación administrada fue artificial con luz blanca a 53 lumen/W en un ciclo de luz/obscuridad de 12/12. El pH se controló usando CO₂ atmosférico (350ppm). La microalga se dejó aclimatar por un periodo de un mes.

5.1.2 Selección del medio de cultivo.

Para cultivar la microalga como ingrediente para el alimento de tilapia, se buscó ante todo, obtener un producto de alta calidad libre de contaminantes que pudiera ser obtenido a bajo costo, con lo cual, se buscó producir la microalga al menor costo posible. Se sabe que las microalgas pueden ser cultivadas en aguas residuales de distintas fuentes como son industrial, doméstico y agrícola, ya que crecen de una manera adecuada en los nutrientes presentes en estas aguas (Park et al., 2011a, Park et al., 2011b, Abdel-Raouf et al., 2012). De no ser tratadas, estas aguas pueden ocasionar graves problemas de eutrofización, que es una consecuencia de la elevada concentración de nutrientes como es el caso de nitratos y fosfatos. Por tal motivo y con la finalidad de producir las microalga a bajo costo e impactar de manera positiva en el ambiente, se seleccionó como medio de cultivo el agua residual proveniente de un invernadero de producción de jitomate, sin embargo primero se tuvo que evaluar la factibilidad de cultivarla en este tipo de medio.

Experimento agua residual de invernadero vs medio comercial BG11.

Para evaluar la factibilidad de utilizar el agua residual de invernadero de un cultivo de jitomate, se decidió comparar el experimento con el medio BG11. El experimento se llevó a cabo bajo las mismas condiciones en las que se realizó la aclimatación de la microalga, es decir, se agregó el inóculo en botellas de un litro, controlando luz, aireación, pH, fotoperiodo y temperatura. Se prepararon dos medios: agua destilada estéril y medio BG11 al 2% como control y agua residual del invernadero. El experimento se realizó por duplicado, por lo que se pusieron 2 botellas con cada medio. Antes del experimento las botellas fueron esterilizadas en autoclave por 20 min a 121°C y como desinfección adicional se colocaron por 30 min en una cámara con luz UV. Las mediciones fueron tomadas una vez al día, a las 9:00am. El volumen de muestra tomado diariamente fue de 3mL y no se agregó más medio para no diluir la concentración en las botellas. Para cuantificar el crecimiento se utilizó un espectrofotómetro marca Lamote, midiéndose la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm, realizándose la medición por triplicado. De acuerdo a la ley de Lambert y Beer, cuando el valor de la absorbancia estaba por encima de 0.8 se realizaron diluciones para llevarlo a un valor entre 0.3 y 0.8 y disminuir el error en la medición.

El pH fue ajustado a 8.4 con NaOH y HCL solo inicialmente después de inoculada las botellas. Para verificar la concentración de nutrientes inicial y asegurar que esto no sería una limitante, se midió nitratos (NO_3^-) y fosfatos (PO_4^{3-}). El primero con un medidor laquatwin de la marca Horiba y el segundo con un medidor de la marca Hanna.

Todas las botellas fueron inoculadas a una densidad óptica inicial de 0.2. Se realizó observación diaria a microscopio, para asegurar que las botellas no estuvieran contaminadas con otros microorganismos que pudieran afectar el experimento.

5.1.3 Experimento nutrientes

Para poder evaluar si la microalga *N. limnetica*, podía ser cultivada en el agua residual del invernadero de la producción de jitomate a lo largo de las variaciones de todo el año, se verificó con datos proporcionados por la empresa de la cual se

obtuvo el agua residual, el comportamiento de los nutrientes (NO_3^- y PO_4^{3-}) en el agua del 2012 al 2016. La empresa analiza su agua residual quincenalmente mandando sus muestras al laboratorio Relab den Haan en los países bajos. Se obtuvo la concentración para NO_3^- y PO_4^{3-} que aparecía con mayor frecuencia “Más frecuente”, el valor máximo y el valor mínimo.

Con base a los datos obtenidos se llevó a cabo el experimento. *N. limnetica* fue inoculada por duplicado en las tres concentraciones (máximo, mínimo y más frecuente) y se evaluó el comportamiento. Para preparar las concentraciones se utilizó la misma fórmula que se utiliza en el invernadero, para mantener la misma proporción de nutrientes y se realizaron diluciones. De igual manera que el experimento anterior, el resultado se llevó a cabo bajo condiciones controladas y estériles, en botellas de un litro.

Se realizó observación diaria a microscopio, para asegurar que las botellas no estuvieran contaminadas con otros microorganismos que pudieran afectar el experimento.

5.1.4 Crecimiento de la microalga

Para poder evaluar el aumento en el crecimiento promedio de las microalgas se calculó la tasa de crecimiento a partir de la pendiente de la regresión lineal en la fase del crecimiento exponencial.

$$k = (\ln N - \ln N_0) / (t - t_0)$$

Donde k (d⁻¹) es la tasa de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial, N_0 es la densidad óptica al inicio de la fase exponencial (t_0) y N representa la densidad óptica al tiempo (t) de la fase exponencial.

También se evaluó el tiempo de duplicación de las microalgas (T), es decir, el tiempo en días en que tarda una célula en duplicarse.

$$T = \ln 2 / k$$

5.1.5 Escalamiento

Con la finalidad de obtener suficiente microalga *N. limnetica* para la elaboración de la dieta, se escaló la microalga en una proporción 1:10 de los frascos de 1 L a un biorreactor de 60L y finalmente a un fotobiorreactor en el exterior de 600L.

5.1.6 Cosecha

Se buscó alcanzar una cosecha semicontinua. Para lograrlo se inocularon los biorreactores en la proporción 1:10 con una concentración de .200 de densidad óptica en agua proveniente de invernadero (previa esterilización con Hipoclorito de sodio). Ya que el cultivo creció después de unos días, se pasó a diluirlo (removiéndose un volumen y agregándose la misma cantidad de nueva agua de desecho proveniente de invernaderos) a una concentración conocida y de nuevo se dejó crecer el cultivo, a esto se le llama cosecha continua. Esto se repitió durante varias ocasiones, hasta alcanzar la cantidad de microalga suficiente. La microalga en el agua al ser extraída de biorreactor fue transportada a una centrifuga marca centrimax para su separación.

5.1.7 Procesamiento postcosecha

La microalga húmeda se almacenó en un congelador a -20°C hasta su secado. Para obtener un polvo que pueda ser utilizado para elaboración del alimento, la microalga fue secada en horno de convección forzada a 40°C durante 3 días y después molida en licuadora.

5.2 Dietas

Para el experimento se buscó comparar una dieta comercial ya conocida de la marca PURINA como control VS dietas de la marca comercial Purina enriquecidas con la microalga *N. limnetica* en la siguiente proporción:

1. Purina 100%
2. Purina 95% + 5% de la microalga *Nannochloropsis limnetica*.
3. Purina 90% + 10% de la microalga *Nannochloropsis limnetica*.
4. Purina 85% + 15% de la microalga *Nannochloropsis limnetica*.

En la elaboración de las dietas es de suma importancia que esté balanceada y cumpla con los nutrientes esenciales para el óptimo crecimiento de la Tilapia. Con base a la bibliografía revisada como se hace constatar en la sección de fundamentación teórica, la dieta balanceada se buscó estuviera dentro de los siguientes parámetros.

Cuadro 6. Requerimientos nutricionales de la tilapia revisados en bibliografía.

Requerido	Proteína %	Lípidos %	Carbohidratos %	Humedad %	Cenizas %
	30-40	6-12	20-40	<15%	5-15

Para corroborar que las dietas estarían balanceadas manejando los porcentajes deseados, tanto la biomasa microalgal como el alimento de purina comercial, se mandaron a analizar en su composición mediante análisis bromatológicos al laboratorio Acuícola de la Universidad Autónoma de Querétaro y a un laboratorio certificado por la ENMA: DEQSA LAB S.A. de C.V. Con base a los resultados, se elaboraron las dietas.

Para obtener la microalga en suficiente cantidad y ver cuánto alimento comercial se debería adquirir. Por cuestiones prácticas se consideró como se describe en la fundamentación teórica que el juvenil va desde 0.5g hasta los 50 g, también se consideró que la capacidad de carga en tilapia es máximo de 40 g/L, esto significa que por cada litro de agua, se pueden tener 40g de pez. Con base a esto y calculando el DFR% (alimento que se debe dar por gramo de pez) se determinó cuanto alimento se ocuparía en la totalidad del experimento. Se consideró que con

base al peso que se esperaba obtener al crecer los peces, se requeriría alimento para peces de 0.5 hasta los 50g.

El alimento ya producido se almacena en un cuarto seco para evitar oxidación y formación de hongos.

5.3 Validación de la dieta.

Para el experimento se introdujeron 21 peces de 0.6 g de peso, en etapa de juvenil, por cada una de las 12 peceras. Las peceras son de acrílico y se montaron controlando las variables de la manera siguiente: oxigenación constante, sistema de filtración, termostato y chiller para controlar la temperatura en el óptimo de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, iluminación con luz blanca con fotoperiodo 12 h luz (07.00-19.00) 12hrs oscuridad (19.00-07.00), pH entre 7 y 9, salinidad menor a 1.5 g/L, oxígeno disuelto mayor a 5mg/L, amonio y nitritos por debajo de 0.1 mg/L.

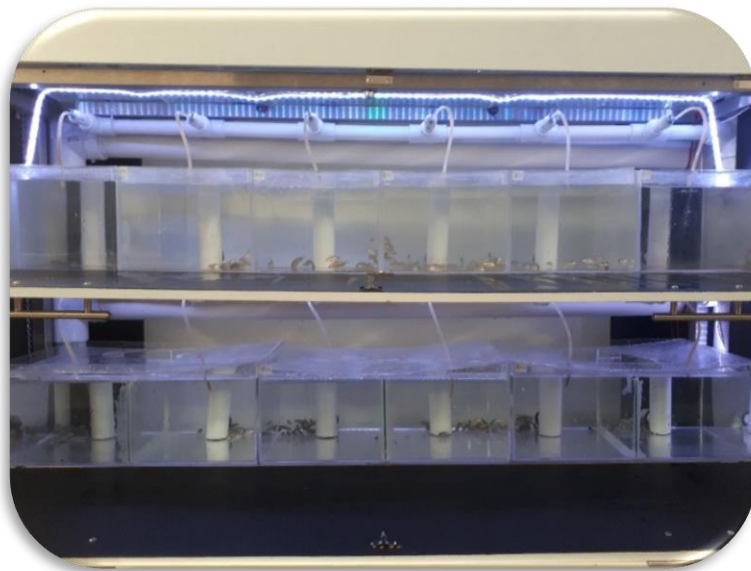


Ilustración 1 Peceras de acrílico donde se acomodaron los alevines de tilapia.

El experimento se llevó a cabo por un periodo de 8 semanas, donde diariamente se midió el oxígeno disuelto, temperatura, pH y salinidad, por otro lado y los productos de N, amonio y nitrito se midieron una vez a la semana.

A todos los peces se les dio la dieta control por 7 días para que se adaptaran a la alimentación y prácticas de manejo. Se tomó un pez de cada una de las 12 peceras y se congelaron para su posterior análisis bromatológico. Después de eso se les dieron las 4 dietas con tres replicas por tratamiento. 1 vez por semana se llevaron a cabo biometrías de 3 peces de cada pecera, para estimar el % de peso ganado, tasa de crecimiento específico (T.E.C.), proporción de alimento convertido (T.C.A.) y consumo diario de alimento (DFI). Para poder realizar el pesaje se colocaron en un recipiente con agua previamente colocado en una báscula y tarada a cero.

Los cálculos se realizarán de la manera siguiente:

- Supervivencia %= Organismos finales por 100/ organismos iniciales.
- Peso ganado % (WG)= $100 \times (\text{Peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}$: Este parámetro te indica cuanto peso gano el individuo en un periodo de tiempo.
- Tasa de crecimiento específico % d^{-1} (SGR)= $100 \ln (\text{peso final} - \ln \text{peso inicial}) / \text{días del experimento}$: Este parámetro nos indica la tasa a la que está aumentando o disminuyendo el individuo en un periodo de tiempo.
- Peso ganado individual mg/día (ADG) = $(\text{Peso final} - \text{peso inicial}) / \text{Edad en días}$: Cuanto aumenta en peso un individuo en promedio por día.
- Alimento consumido mg/día (FI) = $1000 \times (\text{Sumatoria del alimento individual dado por semana} / \# \text{ de días})$: Cuanto alimento consume un individuo en promedio por día.
- Tasa de conversión alimenticia (TCA) = $\text{Alimento ingerido} / \text{ADG}$ (ambas en gramos). También se puede como= $\text{peso del alimento seco} / \text{peso ganado húmedo}$: Eficiencia con la que los individuos convierten el alimento ingerido en biomasa. Valores bajos indican gran eficiencia en el uso del alimento. El promedio en tilapia es de 1.5
- Consumo de proteína (mg/día)= $\text{ADG} \times (\text{Proteína alimento \%BH}/100)$: Cuanta proteína es consumida diariamente por el individuo.
- Consumo de nitrógeno= $\text{Consumo de proteína (mg/día)} \times 6.25$. Cuanto nitrógeno es asimilado diariamente por el individuo.

- Nitrógeno retenido= $\frac{((\text{Peso final promedio} \times \text{Proteína cuerpo final}) - (\text{Peso inicial promedio} \times \text{Proteína cuerpo inicial}))}{100 / \# \text{ de días} / 6.25}$: Cuanto nitrógeno es asimilado por el pez.
- Relación de eficiencia proteica (PER)= $\text{ADG} / \text{Consumo de proteína}$: Este parámetro te da una idea de la calidad de la proteína, si el pez no crece, este valor será de 0. Este parámetro también te da una idea del consumo y digestibilidad ya que indica si los aminoácidos han podido ser asimilados.
- Uso aparente de Nitrógeno UAN %= $100 \times (\text{N retenido} / \text{Consumo de N})$

La proporción de alimentación diaria (DFR%) fue ajustada semanalmente de acuerdo al peso corporal (BW) utilizando la función $\text{DFR} = 0.952 \ln \text{BW} + 7.09$ (Japanese Fisheries Agency 1995), por lo que se realizó de manera semanal el conteo (para contabilizar sobrevivencia). Se dio el alimento tres veces al día a las 8 am, 12pm y 4pm. El alimento se dio en polvo a lo largo de todo el experimento para que la microalga estuviera bien mezclada.

Al finalizar el experimento se tomó un pez de cada pecera para realizar los análisis bromatológicos y compararlos con los iniciales. Para los bromatológicos se realizaron los mismos que para el alimento.

Los resultados para supervivencia, crecimiento, eficiencia de utilización de alimento, y composición del cuerpo fueron analizados estadísticamente usando un análisis de varianza ANOVA. Las diferencias entre los tratamientos fueron evaluados por significancia ($P < 0.05$) usando el método de Tukey. Para corroborar los resultados ya que se encontró alta competencia de los organismos, lo que resultaba en organismos grandes y pequeños en la misma pecera, se realizó otra prueba con un método no paramétrico, la prueba de Kruskal-Wallis, y de igual manera los tratamientos fueron evaluados por significancia ($P < 0.05$).

5.4 Normatividad

Para el cuidado y manejo de los organismos con los cuales se estarán trabajando, se tomarán en cuenta la Norma Oficial Mexicana (NOM), es importante considerar

el uso de bata, guantes, y alcohol cuando se esté trabajando con las microalgas y peces para evitar contaminarlos. Desinfectar el material previo a la inoculación con hipoclorito de sodio evitará contaminación de bacterias y otros microorganismos patógenos.

Las NORMAS que se consideraron son:

NOM-048-SSA1-1993 Establece el método normalizado para la evaluación de riesgos a la salud como consecuencia de agentes ambientales.

NOM-120-SSA1-1994 Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

NOM-128-SSA1-1994 Bienes y servicios. Que establece la aplicación de un sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en la planta industrial procesadora de productos de pesca.

NOM-001-SEMARNAT-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

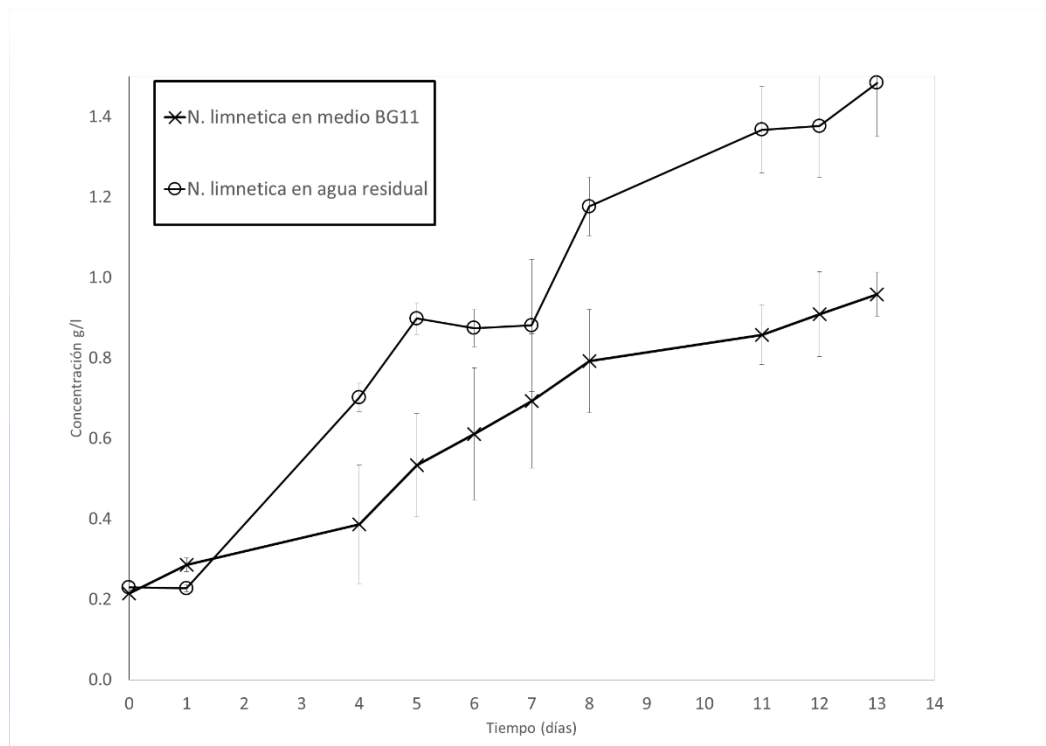
6. Resultados y discusión

6.1 Cultivo y cosecha de la microalga en agua residual de invernadero.

N. limnetica CCMP2260 pudo ser cultivada en el agua proveniente del cultivo de jitomate de un invernadero hidropónico como puede observarse en la gráfica 1. Comparándose el desarrollo en el agua residual contra el medio BG11, se obtuvo mejor crecimiento en el agua residual, con una tasa de crecimiento de 0.14 y 0.11 d⁻¹ respectivamente y un tiempo de duplicación para *N. limnetica* en agua residual de 4.95 y en medio BG11 de 6.3. Yubin, et al (2014), al igual que el presente experimento, evaluaron la tasa de crecimiento de 9 cepas de *Nannochloropsis*, entre ellos *N. limnetica*, inoculándola también en medio BG11, obteniendo una tasa de crecimiento de 0.07 d⁻¹, lo que nos ayuda a corroborar la eficiencia del uso del agua residual del invernadero para cultivar la microalga *N. limnetica*. Esto se puede explicar por la cantidad de nutrientes disponibles en el medio. Como todos los

organismos, las microalgas tienen un mejor crecimiento cuando la concentración de nutrientes es óptima para ellas y varía dependiendo de la especie. Esto quiere decir que a una concentración de nutrientes alta o baja el crecimiento disminuye. Makareviciene (2011) cultivando *Chlorella* sp. en medio BG11, encontró, que a tres diferentes concentraciones de nitrato de 203, 544 y 1094.21 ppm, el crecimiento fue afectado, considerando los 10 primeros días de cultivo, obtuvo un mayor crecimiento en el menos concentrado, siguiéndole la segunda y tercera concentración. Esto indica en nuestro caso, que la concentración de nutrientes existentes en el medio de agua residual de invernadero del cultivo de jitomate es más adecuada para la microalga *N. limnetica*, que la que le proporciona el medio BG11.

Gráfica 1 Tendencia de crecimiento de la microalga *Nannochloropsis limnetica* cultivada en dos medios: Agua residual de invernadero de producción hortícola y en un medio comercial BG11.



Por otro lado es también importante considerar la proporción de los nutrientes en el medio. Para el caso de nitrógeno y fósforo, una proporción de 16:1 es la más adecuada (Oswald, 1998), aunque varía dependiendo de la especie y de las

condiciones externas como luz o temperatura, ya que de estas dependerán los requerimientos de la microalga. Una proporción alta de nitrógeno, respecto a fósforo, sugiere una limitación de fósforo, y una proporción baja, sugiere una limitación de nitrógeno. Por lo tanto, limitaciones o excesos, de estos dos nutrientes, pueden afectar el crecimiento de las microalgas (Borowitzka, 1998). Esto lo podemos corroborar con lo encontrado por Mayers, (2014). Observo que proporciones de N:P mayores a 32:1 afectan gravemente la productividad, ya que las células comienzan a tener problemas para dividirse debido a la falta de Fósforo. En nuestro experimento la concentración de NO_3^- y PO_4^{3-} y sus proporciones, se describen en la siguiente tabla:

Cuadro 7 Concentración y proporción N:P de NO_3^- y PO_4^{3-} en el medio BG11 y en el agua residual de invernadero de cultivo de jitomate.

	NO3 (ppm)	PO4 (ppm)	Proporción N:P
BG11	1094	5.25	124:1
Agua residual de invernadero	830	120	5:1

La proporción tan alta entre nitrógeno respecto a fósforo, que hay en el medio BG11 como se indica en la tabla 1, sugiere que la limitación de fósforo puede ser la razón principal por la que se obtuvo un mejor crecimiento en el agua residual de invernadero. Aunque algunos autores lo utilizan para evaluar el crecimiento de microalgas de agua dulce (Makareviciene, 2011., Yubin et al., 2014), el medio BG11, debe ser usado más para mantener cultivos y no para crecer microalgas de manera óptima. De los datos analizados mencionados en la sección 2.3, se obtuvo la proporción de N:P en el agua residual a lo largo del año. La que aparece con más frecuencia es 5:1, lo que concuerda con la proporción obtenida en este experimento, pero va desde 4:1 hasta 25:1. Sin embargo estas proporciones siguen dentro del rango requerido por las microalgas. Para el medio de agua residual de invernadero, una proporción de N:P de 5:1, parece ser adecuado para el crecimiento

de *N. limnetica*, aunque se requiere una investigación posterior, para encontrar el óptimo de crecimiento.

Ya que se pudo constatar que la microalga *N. limnetica* puede crecer en agua residual de invernadero de producción de jitomate, el siguiente paso fue comprobar, que puede ser cultivado a las diferentes concentraciones de nutrientes que se dan a lo largo de todo el año, ya que varían considerablemente, como se puede constatar en la tabla 2, donde se observa la concentración mínima, máxima y la más frecuente para NO_3^- y PO_4^{3-} .

Cuadro 8 Valores máximos, mínimos y más frecuente, de nutrientes encontrados en las aguas residuales de producción hortícola de invernadero del 2012 al 2016.

	Nitratos (ppm)	Fosfatos (ppm)
Máximo	2347.9	337
Más frecuente	886	160
Mínimo	664.5	93

Los tres medios preparados a partir del histórico del agua residual del invernadero del 2012 al 2016 se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 9 Medios preparados para evaluar si la microalga *N. limnetica* puede crecer en las variaciones de nutrientes existentes en el agua residual del invernadero del cultivo de jitomate.

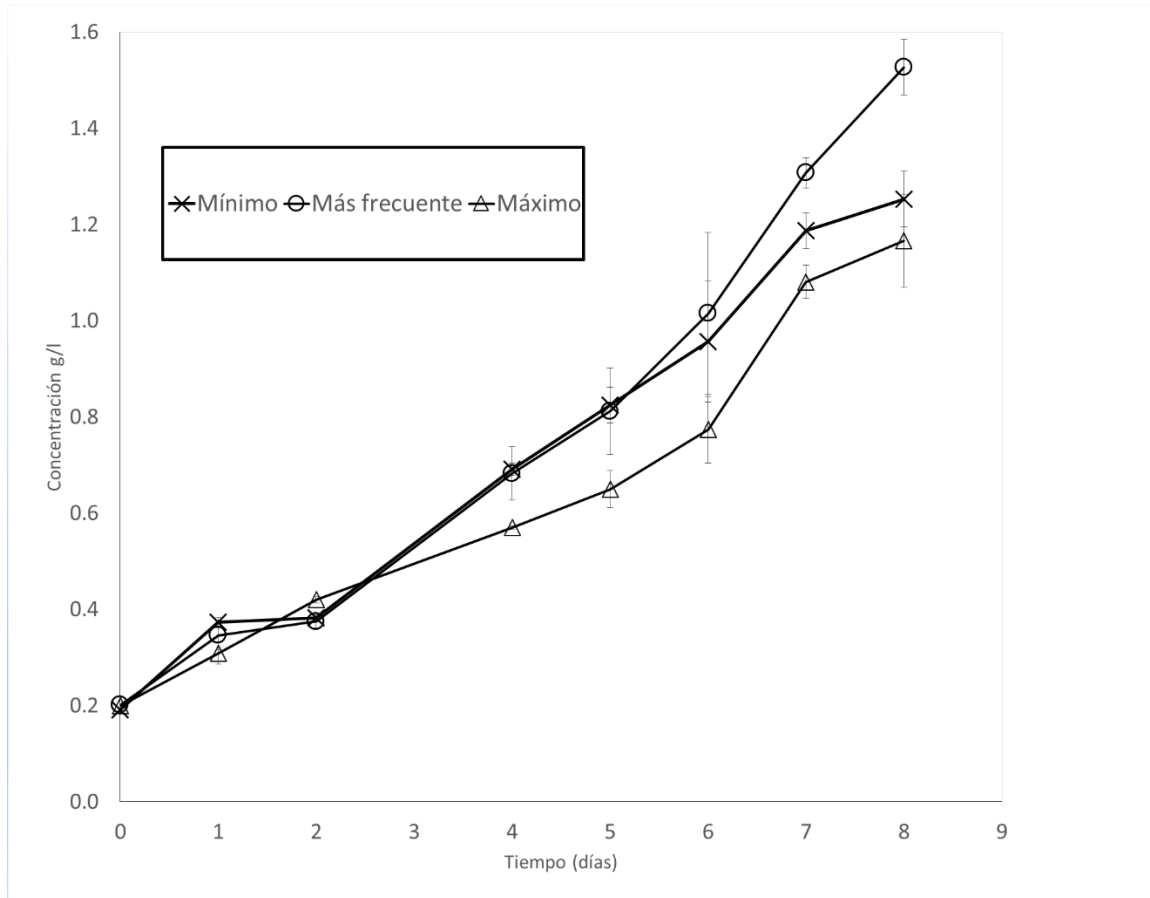
	Nitratos (ppm)	Fosfatos (ppm)
Máximo	2112.8	302.5
Más frecuente	1052	238
Mínimo	618	121.55

Como se puede observar en la gráfica 2, la microalga *N. limnetica* pudo ser cultivada en agua residual de invernadero de manera satisfactoria y crecer a las diferentes concentraciones de nutrientes existentes en el agua residual a lo largo de todo el año de producción de jitomate. Sin embargo se obtuvo un mejor crecimiento en la más frecuente, siguiéndole la mínima y la máxima. Las tasas de crecimiento y tiempo de duplicación se observan en el cuadro 10.

Cuadro 10 Tasas de crecimiento y tiempo de duplicación para la microalga *N. limnetica* a tres concentraciones diferentes en agua residual de invernadero de producción de jitomate.

	Tasa de crecimiento d⁻¹	Tiempo de duplicación
Máximo	.21	3.35
Más frecuente	.24	2.94
Mínimo	.22	3.12

Gráfica 2 Crecimiento en el tiempo de la microalga *N. limnetica* en tres concentraciones diferentes de agua residual de invernadero de producción de jitomate.



Con base a la información obtenida, se pudo escalar las microalga *N. Limnetica* de manera óptima hasta los reactores de 600L en el exterior.

6.1.1 Escalamiento y procesamiento.

Ya que se obtuvo suficiente inoculo y se encontraron las condiciones de crecimiento a escala de un litro, se inoculó manteniendo una proporción de 1:10, el reactor de 60L en agua residual del invernadero. Es importante mencionar que la esterilidad y

asepsia con la que se manejó el cultivo, fueron necesarios para evitar contaminaciones. La tasa de crecimiento obtenida fue mayor que en el cultivo en botellas alcanzándose hasta 0.37 d⁻¹, lo que era esperado ya que en el fotobiorreactor tubular cerrado que se construyó, la incidencia de luz es mayor y se le inyectó CO₂ para controlar el pH y como fuente de carbono.



Ilustración 2 Fotobiorreactor tubular cerrado de 60L.

Cuando la concentración de microalga dentro del biorreactor de 60L se incrementó, se inocularon los biorreactores tubulares cerrados MK-750 con un volumen total cada uno de 600L, midiéndose el crecimiento por densidad óptica a 750nm.

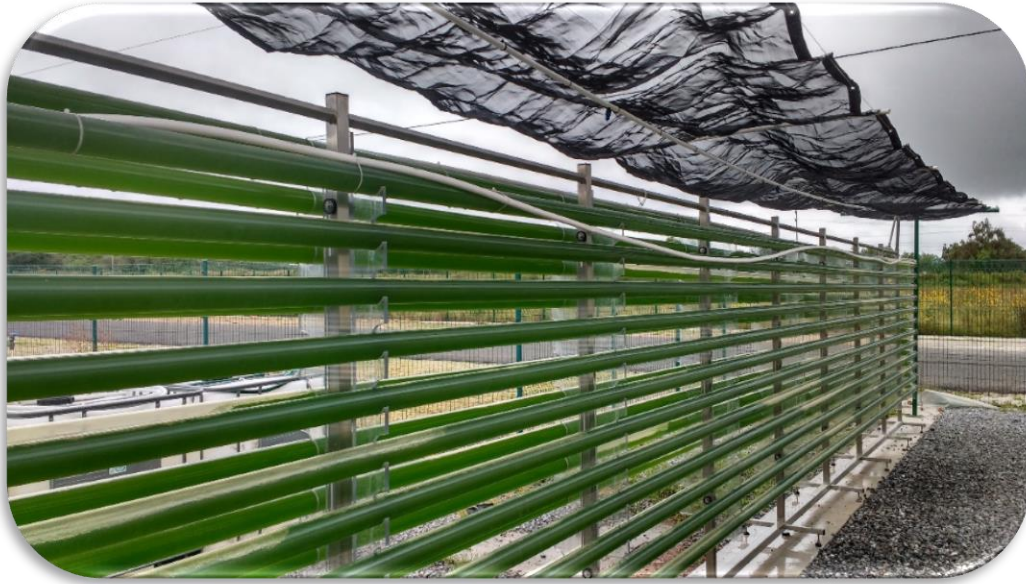


Ilustración 3 Fotobiorreactores de 600L donde se cultivó la microalga *Nannochloropsis limnetica*.

En cuanto se alcanzó una concentración óptima de 1.5 de densidad óptica a 750nm, se cosechó, es decir, se separó el agua de la microalga, llevándose a cabo, en una centrifuga industrial marca Centrimax y posteriormente se almacenó a -20°C. Como paso final la muestra se secó en horno a 40°C almacenándose hasta su uso en la elaboración de las dietas.

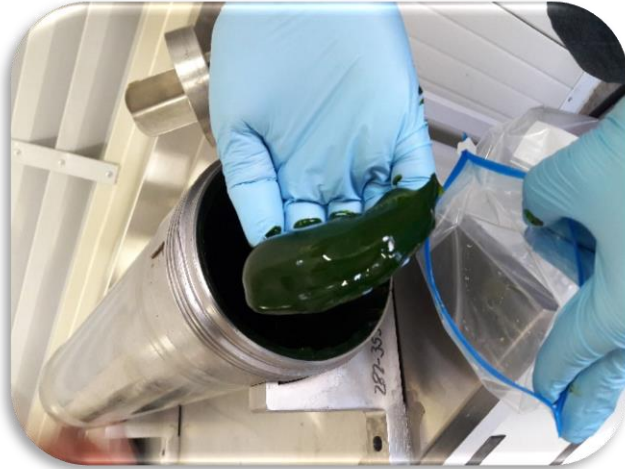


Ilustración 4 Microalga *Nannochloropsis limnetica* al ser centrifugada (izquierda) y congelada (derecha).



Ilustración 5 Microalga después de ser secada en horno a 40°C y lista para ser utilizada como alimento para tilapia.

6.2 Dietas.

En el cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos de la composición nutrimental de los dos ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas.

Cuadro 11 Bromatológicos del alimento control de Purina y de la microalga *N. limnetica*.

Ingrediente	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Cenizas	Humedad
Purina	26.98	5.19	50.11	8.72	9
<i>N. limnetica</i>	37.75	13.76	21.54	17.76	9.19

Posteriormente se elaboraron 4 dietas balanceadas con diferentes proporciones de microalga. Cabe remarcar que en la etiqueta proporcionada por el proveedor de Purina, mencionan que la proporción de proteína en su alimento está por encima del 32%, lo que en los análisis realizados no salió así, con lo que se puede constatar que las dietas enriquecidas con microalga cubren de manera más eficiente los requerimientos de la tilapia ya que Purina tanto en proteína como en carbohidratos esta fuera del rango. Probablemente incluyen más carbohidratos para abaratar costos, ya que la proteína proveniente de harina de pescado, es lo que representa un mayor costo.

Cuadro 12 Dietas finales respecto a los requerimientos nutricionales de la tilapia.

	Proteína %	Lípidos %	Carbohidratos %	Humedad %	Cenizas %
Requeridos	30-40	6-12	20-40	<15	5-15
Purina 100%	26.98	5.19	50.11	9.00	8.72
Purina 95% + NL 5%	27.52	5.62	48.68	9.01	9.17
Purina 90% + NL 10%	32.58	6.78	33.65	11.72	15.28
Purina 85% + NL 15%	32.86	7.16	32.98	11.58	15.41

6.3 Validación de la dieta.

Los efectos de las dietas experimentales en el crecimiento de los peces y el uso del alimento en los 60 días que duro el experimento, se pueden observar en el cuadro 13. Todas las dietas en general fueron bien aceptadas ya que no se encontró diferencia significativa respecto al control para ninguna de las 4 dietas. Estos datos indican que la microalga *N. limnetica* puede reemplazar sin ningún problema la proteína proveniente de harina de pescado. Los valores más altos de supervivencia se obtuvieron en el control y en la dieta Con + 10% NL. Las diferencias en supervivencia se atribuyen al manejo ya que no se observó ningún deterioro en los peces relacionados al efecto de la microalga.

VARIABLES clave como peso final, longitud final, altura máxima final, peso ganado, tasa de crecimiento específico, peso ganado individual, alimento consumido, tasa de conversión alimenticia, consumo de proteína, consumo de nitrógeno y PER, no mostraron diferencias significativas.

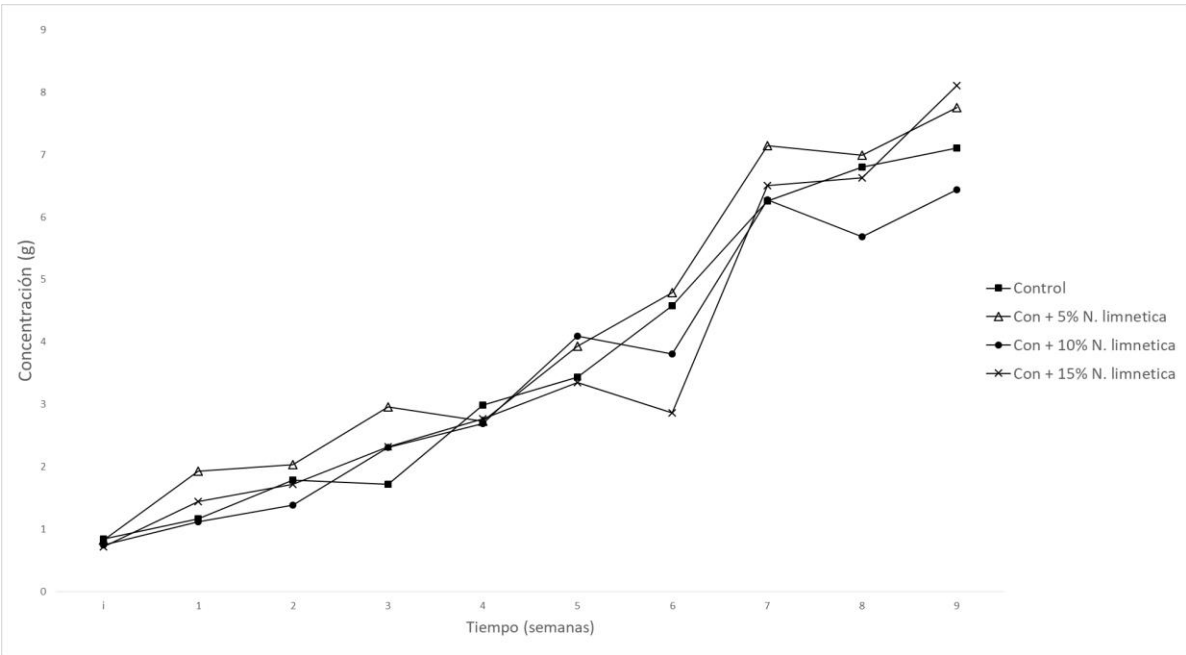
Cuadro 13 Crecimiento promedio y asimilación del alimento para *Oreochromis niloticus* alimentada con las dietas experimentales.

Valores Promedio ¹	Dieta			
	Control	Con + 5% NL	Con + 10% NL	Con + 15% NL
Supervivencia %	96.67 ^a	95.00 ^a	96.67 ^a	93.33 ^a
Peso inicial (mg)	840 ^a	820 ^a	748 ^a	717 ^a
Peso final (mg)	7107 ^a	7757 ^a	6437 ^a	8103 ^a
Longitud patrón inicial	26.290 ^a	28.820 ^a	27.450 ^a	28.180 ^a
Longitud patrón final (mm)	72.791 ^a	74.380 ^a	68.660 ^a	77.700 ^a
Altura máxima inicial (mm)	10.760 ^a	10.560 ^a	9.600 ^a	10.510 ^a
Altura máxima final (mm)	21.660 ^a	23.430 ^a	20.960 ^a	23.160 ^a
Peso ganado (%)	754 ^a	848 ^a	815 ^a	1049 ^a
Tasa de crecimiento específico (% d-1)	3.554 ^a	3.736 ^a	3.688 ^a	4.060 ^a
Peso ganado individual (mg /día)	242.727 ^a	255.450 ^a	288.385 ^a	217.745 ^a

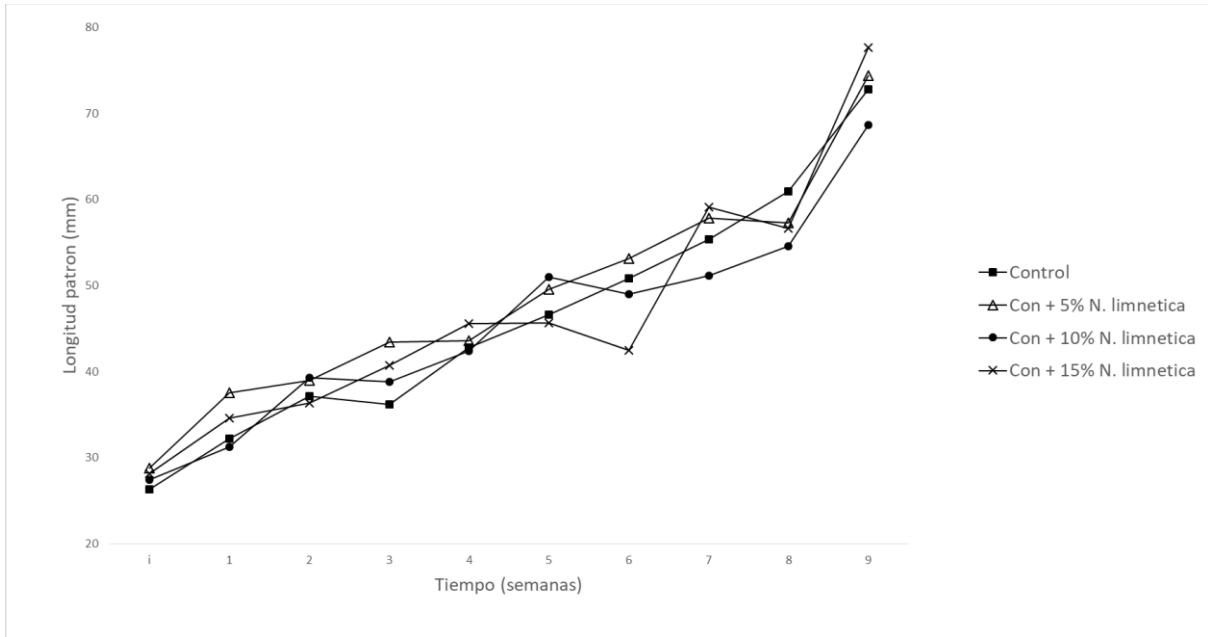
Alimento consumido (mg /día)	247.601 ^a	268.137 ^a	273.969 ^a	264.843 ^a
Tasa de conversión alimenticia	1.020 ^a	1.050 ^a	0.950 ^a	1.216 ^a
Consumo Proteína (mg /día)	6.680 ^a	8.679 ^a	8.290 ^a	7.658 ^a
Consumo de N (mg /día)	1.069 ^a	1.389 ^a	1.326 ^a	1.225 ^a
PER	36.337 ^a	29.434 ^a	34.788 ^a	28.433 ^a

¹ Los valores seguidos por las mismas letras con subíndice no son significativamente diferentes (p > 0.05).

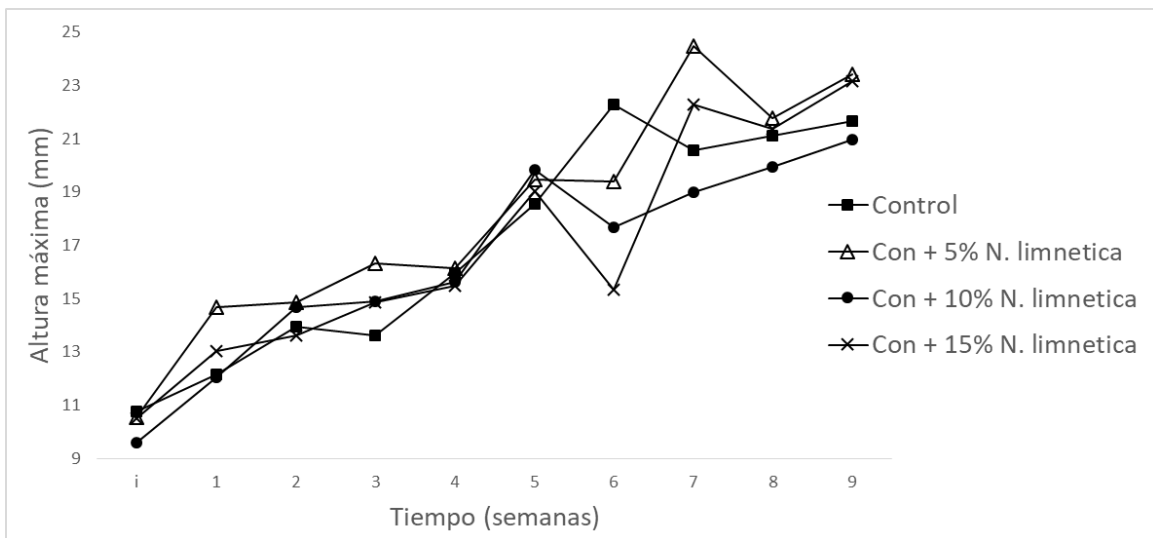
Gráfica 3 Tendencia de crecimiento en g para las dieta control y las dietas enriquecidas con microalga al 5%, 10% y 15% en el tiempo.



Gráfica 4 Tendencia de crecimiento en la longitud patrón para las dieta control y las dietas enriquecidas con microalga al 5%, 10% y 15% en el tiempo.



Gráfica 5 Tendencia de crecimiento en la altura máxima para las dieta control y las dietas enriquecidas con microalga al 5%, 10% y 15% en el tiempo.



6.4 Aminoácidos *Nannochloropsis limnetica* vs requerimientos de tilapia.

Como se menciona anteriormente, con base a los resultados obtenidos, la microalga *N. limnetica* pudo reemplazar de manera muy eficiente la proteína de harina de pescado hasta en un 15% ya que no se encontró diferencia significativa. Esto se puede constatar con la eficiencia de utilización del alimento, ya que la proteína si está siendo asimilada. Si comparamos los requerimientos nutricionales de la tilapia con los aminoácidos aportados por la microalga *N. limnetica* se puede observar que en su mayoría cubren los requerimientos de la tilapia (Cuadro 14), en especial el de la Arginina y la Lisina, de gran importancia para las especies acuícolas. Sin embargo si se presenta una deficiencia en Metionina y triptófano lo que a largo plazo puede ocasionar alta mortalidad y cataratas bilaterales (FAO, 1994), aunque eso no se observó en el presente experimento, es importante tomarlo en cuenta para que se use la microalga *N. limnetica* en dietas de pescado como un complemento o se incluyan harinas que contengan estos 2 aminoácidos antes mencionados, como es el caso la harina de soya que si los contiene.

Cuadro 14 Aminoácidos requeridos para la tilapia *Oreochromis niloticus* Vs los aminoácidos proporcionados en *N. limnetica*.

Aminoácidos	Requerimientos aminoácidos tilapia	Aminoácidos en <i>N. Limnetica</i>
Arginina	1.81	7.55
Histidina	0.75	1.33
Isoleucina	1.34	3.28
Leucina	1.46	9.83
Lisina	2.2	6.98
Metionina	0.75	0.66
Fenilalanina	2.38	5.32
Treonina	1.7	4.04
Triptofano	0.43	0
Valina	1.2	7.41

Es importante remarcar que la microalga *N. limnetica* posee valores nutricionales adecuados para el crecimiento de juveniles de la tilapia hasta una inclusión del 15%,

enriqueciendo un alimento comercial de alta calidad como es la marca purina. No se encontró información de esta microalga siendo usada en dietas para la alimentación de la tilapia, de allí la importancia de la presente investigación. Sin embargo es importante considerar diferentes investigaciones con otras microalgas que si encontraron efectos negativos en inclusiones altas. El-Dahhar, et al. (2014) usaron la microalga *Nannochloropsis oculata* para alimentar alevines de *Liza Ramada* en una proporción de 0, 7, 14, 21, 28% encontrando los mejores resultados respecto a peso ganado y tasa de conversión alimenticia al 21% siendo afectado el crecimiento del pez por encima de estos valores. Esto también concuerda con lo encontrado por Olvera, et al. (1998), quien utilizando alevines de tilapia con la microalga *Spirulina maxima* en proporción de 20, 40, 60, 80 y 100% obtuvo los mejores resultados con 40%. El-Sayed, et al. (2013) también encontró que se puede utilizar la microalga *Spirulina* hasta en un 50% para mejorar el crecimiento de la tilapia. Estas investigaciones sugieren que hay que tener cuidado con inclusiones altas de microalga, principalmente por cuestión de palatabilidad, pero ayudan a reforzar nuestra investigación comprobando que las microalgas si pueden ser usadas para substituir proteína animal, pero que debe ser complementada con otros ingredientes que contengan los aminoácidos que no contiene la microalga *N. limnetica*. También es importante agregar que aunque en nuestro caso solo se enriqueció un alimento comercial, a futuro se esperaría poder substituir completamente la harina de pescado por lo que se podría realizar una nueva investigación al respecto aunque cabe esperar un resultado parecido.

6.5 Costos.

Es de suma importancia considerar el costo de una dieta enriquecida con microalga, ya que muchos productores solo incluirán este tipo de ingredientes en la dieta para sus peces si el precio es menor, o si el precio es parecido pero le pueda aportar un beneficio adicional. Con base a este criterio y considerando reemplazar por completo la harina de pescado, se realizó un análisis del costo de los principales ingredientes usados para la elaboración de una dieta en el mundo. Principalmente se buscaron ingredientes de bajo costo con alto contenido de proteína, que cubran todos los requerimientos de la tilapia. Los más usados son harina de pescado,

harina de soya, harina de trigo, aceite de pescado, lectina de soya y una premezcla de vitaminas y minerales (FAO, 2018). Los costos se evaluaron con base a la siguiente formulación:

Cuadro 15 Formulación de dos dietas elaboradas a partir de Harina de pescado la primera y harina de microalga la segunda.

Ingrediente	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Fibra	Cenizas	Humedad	% empleado	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Fibra	Cenizas	Humedad
Harina de pescado	60	8	5	1	15	11	16.0%	9.60	1.28	0.80	0.16	2.40	1.76
Harina de soya	48	1.2	38.4	4.4	8		40.0%	19.20	0.48	15.36	1.76	3.20	0.00
Harina de trigo	10	2.3	72	11	4.7		32.0%	3.20	0.74	23.04	3.52	1.50	0.00
Aceite de pescado	15	75	10	0	0		4.0%	0.60	3.00	0.40	0.00	0.00	0.00
Lectina de soya	15	75	10	0	0		4.0%	0.60	3.00	0.40	0.00	0.00	0.00
Mix de vitaminas y minerales					100		4.0%	0.00	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00

Total 100%

Final	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Fibra	Cenizas	Humedad	total
	33.20	8.50	40.00	5.44	11.10	1.76	100.00

Ingrediente	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Fibra	Cenizas	Humedad	% empleado	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Fibra	Cenizas	Humedad
Harina de pescado	60	8	5	1	15	11	0.0%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Harina de soya	48	1.2	38.4	4.4	8	0	36.0%	17.28	0.43	13.82	1.58	2.88	0.00
Harina de trigo	10	2.3	72	11	4.7	0	25.0%	2.50	0.58	18.00	2.75	1.18	0.00
Aceite de pescado	15	75	10	0	0	0	2.5%	0.38	1.88	0.25	0.00	0.00	0.00
Lectina de soya	15	75	10	0	0	0	2.5%	0.38	1.88	0.25	0.00	0.00	0.00
Mix de vitaminas y minerales					100	0	2.0%	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00
Harina de microalga	37.75	13.76	21.54	0	17.76	9.19	32.0%	12.08	4.40	6.89	0.00	5.68	2.94

Total 100%

Final	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Fibra	Cenizas	Humedad	total
	32.61	9.16	39.22	4.33	11.74	2.94	100.00

Cuadro 16 Comparación de costos en pesos Mexicanos de un alimento para el estadio de juvenil con y sin la microalga *N. limnetica*.

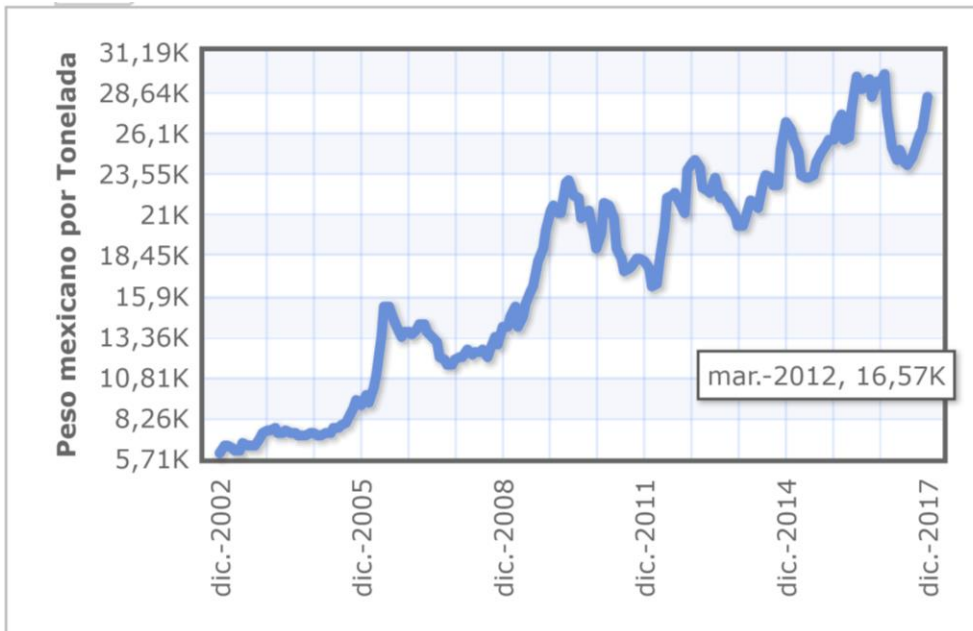
Alimento Inicial sin microalga					
Ingrediente	Cantidad	Costo ingredientes por kilo	Costo de lo usado por kilo	Costo bulto 25 Kg	Costo bulto 25 Kg publico
Harina de pescado	16%	\$ 28.39	\$ 4.54	\$ 336.52	\$ 700.00
Harina de soya	40%	\$ 7.21	\$ 2.88		
Harina de trigo	32%	\$ 8.86	\$ 2.84		
Aceite de pescado	4%	\$ 30.00	\$ 1.20		
Lecitina de soya	4%	\$ 30.00	\$ 1.20		
Mix de vitaminas	2%	\$ 20.00	\$ 0.40		
Minerales	2%	\$ 20.00	\$ 0.40		
Harina de microalga	0%	\$ 35.00	\$ -		
Totales	84%		\$ 13.46		
Alimento Inicial con microalga					
Ingrediente	Cantidad	Costo ingredientes por kilo	Costo de lo usado por kilo	Costo bulto 25 Kg	Costo bulto 25 Kg publico
Harina de pescado		\$ 28.39	\$ -	\$ 331.27	\$ 700.00
Harina de soya	49%	\$ 7.21	\$ 3.53		
Harina de trigo	29%	\$ 8.86	\$ 2.57		
Aceite de pescado	2.5%	\$ 30.00	\$ 0.75		
Lecitina de soya	2.5%	\$ 30.00	\$ 0.75		
Mix de vitaminas	1.0%	\$ 20.00	\$ 0.20		
Minerales	1.0%	\$ 20.00	\$ 0.20		
Harina de microalga	15.0%	\$ 35.00	\$ 5.25		
Totales	100%		\$ 13.25		

En el cuadro 16 se puede comparar el costo de un bulto de 25 kilos de cuanto sale aproximadamente un bulto comercial que utilice como base la harina de pescado y un bulto reemplazando la harina de pescado por la microalga *N. limnetica*. Como se puede constatar, los precios son muy parecidos. Sin embargo considerando que lo que la microalga pretende substituir principalmente es la harina de pescado, vale la pena ahondar un poco más en este punto.

La harina de pescado según el Banco mundial (2018), ha ido incrementando su precio en los últimos 20 años como se puede observar en la gráfica 6. Alcanzando un precio de casi 30 mil pesos la tonelada en el 2016. Eventualmente como se puede constatar con base al incremento poblacional, los precios se seguirán incrementado por lo que eventualmente el costo para la harina de pescado será mucho más caro que el de las microalgas que paulatinamente han ido bajando en

los últimos años, principalmente porque es un ingrediente que no depende de la estacionalidad y de factores como la sobrepesca.

Gráfica 6 Precio mensual de la harina de pescado-Peso Mexicano por tonelada.



Banco mundial (2018)

Por último hay un factor más a considerar como es el Omega 3. Aunque no se hizo el análisis en la presente investigación, autores como Paalares y colaboradores (2016) encontraron que agregando Omega 3 y 6 en la dieta de tilapia se incrementó al doble el contenido de este compuesto en la tilapia, lo que da un valor agregado al consumo de este organismo, ya que como se mencionó en puntos anteriores, este compuesto es de suma importancia en la nutrición humana, por lo que, ya que la harina de pescado normalmente contiene este compuesto pero no todas las microalgas, el que hayamos seleccionado esta microalga que si lo contiene le da la posibilidad de convertirse en un ingrediente esencial en el futuro para la producción

acuícola. Además hay que considerar que el nivel de omega que contiene el aceite de pescado es inferior al que proveen las microalgas por lo que se puede incrementar aún más el contenido de este compuesto en los peces.

6.6 Resumen de resultados y discusión.

La microalga *N. limnetica* puede ser cultivada en agua residual de invernadero de producción hortícola a lo largo de todo el año en cantidad y calidad suficientes para enriquecer dietas para tilapia.

Comparando el crecimiento con el medio BG11, presenta una mejor tasa de crecimiento y menor tiempo de duplicación en agua residual de un invernadero de producción hortícola.

La microalga *N. limnetica* pudo ser utilizada para elaborar 3 dietas en una proporción de 5%, 10% y 15% que cubren los requerimientos nutricionales de la tilapia.

La microalga *N. limnetica* puede reemplazar hasta en un 15% un alimento comercial (Purina) a base de harina de pescado sin diferencias significativas en la supervivencia, asimilación, peso y crecimiento de la tilapia *Oreochromis niloticus*.

EL costo de un alimento enriquecido con un 15% de la microalga *N. limnetica* es muy parecido a un alimento que utiliza la harina de pescado como ingrediente, sin embargo el hecho de que se pueda incrementar el contenido de omega 3, le da un valor agregado, lo que probablemente permitirá una mejor aceptación por los productores de tilapia en el mundo. Además considerando la tendencia al incremento de precios de la harina de pescado, en un futuro cercano, el substituir la harina por microalga como fuente de proteína permitirá obtener un costo menor.

7. Conclusiones

Se pudo elaborar una dieta enriquecida con la microalga *N. limnetica* que cubre los requerimientos nutricionales de la tilapia (*Oreochromis niloticus*), comprobándose que la microalga *N. limnetica* puede reemplazar hasta en un 15% un alimento comercial de alta calidad elaborado a base harina de pescado no encontrándose una diferencia significativa en su crecimiento, supervivencia y asimilación.

8. Bibliografía

- Abdelghany, A. E. (1996). Growth response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to dietary L-ascorbic acid, Lascorbyl- 2-sulfate, and L-ascorbyl-2-polyphosphate. *J. World Aquacult. Soc.* 27: 449–455.
- Abdel-Raouf, N., A.A. Al-Homaidan, I.B.M. Ibraheem. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 257-275.
- Al Hafedh, Y. S. (1999). Effects of dietary protein on growth and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research*. 30: 385–393.
- Anderson, J., Jackson, A. J., Matty, A. J., Capper, B. S., (1984). Effects of dietary carbohydrate and fibre on the tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn.). *Aquaculture*. 37: 303–314.
- Apt, K. E., Behrens, P.W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol.*, 35, 215–226.
- Aragão, C., Conceição, L. E. C., Dinis, M. T., Fyhn, H-J. (2004). Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*, 234, 429–445.
- Banco mundial. 2018. <https://www.indexmundi.com/es/precios-de-mercado/?mercancia=harina-de-pescado&meses=120&moneda=mxn>. 30 enero, 2018.
- Basualdo Ramírez, L. J., Jimenez Guzmán, F., Jiménez Saavedra, A.C., Macal Niño, F.J., Mendoza Quintero Marmol, E.A., Montaña Aguilar, D.V.A., Urcelay Gutiérrez, E (2012). Criterios Técnicos y Económicos para la Producción Sustentable de Tilapia en México, Sagarpa pg, 13-20.
- Becker, W (2004). Microalgae in human and animal nutrition, p. 312– 351. In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford.
- Beveridge, M.C.M., Baird, D.J., (2000). Diet, feeding and digestive physiology. In: Beveridge, M.C.M., McAndrew, B.J. (Eds.), *Tilapias: Biology and Exploitation*. Kluwer Academic Publishing, Norwell, USA, pp. 59–81.
- Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.*, 9, 393–401.

Borowitzka, MA. (2006). Biotechnological & Environmental Applications of Microalgae. Biotechnological & Environmental Applications of Microalgae. [Online] Murdoch University, 2006. [Cited: 26 11 2008.] <http://www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAM-Appl0.html>

Bowen, S.H. (1982). Feeding, digestion and growth—qualitative consideration. In: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. (Eds.), *The Biology and Culture of Tilapias* (ICLARM Conference Proceedings), vol. 7. ICLARM, Manila, pp. 141– 156.

Borgeson, T. L., Racz, V. J., Wilkie, D. C., White, L. J., Drew. M. D. (2006). Effect of replacing fishmeal and oil with simple or complex mixtures of vegetable ingredients in diets fed to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 12:141–149.

Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., and Trenergy, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.*, 11, 247–255.

Caulton, M.S. (1982). Feeding, digestion and growth—qualitative consideration. In: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. (Eds.), *The Biology and Culture of Tilapias* (ICLARM Conference Proceedings), vol. 7. ICLARM, Manila, pp. 157– 180.

Dempster, P., Baird, D.J., Beveridge, M.C.M. (1995). Can fish survive by filter-feeding on microparticles? Energy balance in tilapia grazing on algal suspensions. *J. Fish Biol.* 47, 7– 17.

Drenner, R.W., Taylor, S., Lazzaro, X., Kettle, D. (1984). Particle grazing and plankton community impact of an omnivorous cichlid. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113, 397–402.

Drew, M. D., T. L. Borgeson; D. L. Thiessen. (2007). A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Animal Feed Science and Technology* 138:118–136.

El-Dahhar, A.A., Salama, M.E., Moustafa, Y.T., Elmorshedy, E.M. (2014). Effect of using Algae (*Nannochloropsis Oculata*) in Grey Mullet (*Liza Ramada*) Larval Diets on Growth Performance and Feed Utilization. *Arabian aquaculture society*. Vol 9 No1.

El-Sayed, A.F. M. (1999). Alternative protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture* 179:149–168.

El-Sayed Hussein, E., Dabrowski, K., El-Saidy, D. M. S., Bong-Joo, L. (2013). Enhancing the growth of tilapia larvae/juveniles by replacing plant (gluten) protein with algae protein. *Aquaculture* 44:937–949.

El-Saidy, D. M. S., Gaber, M. M. A. (2003). Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. *Aquaculture Research* 34:1119–1127.

El-Sherif, M. S., A. M. EL-Feky. (2008). Effect of ammonia on Nile Tilapia (*O. niloticus*) performance and some hematological and histological measures. Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Cairo, Egypt.

FAO (1994). Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. Organizaciones de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S01.htm#ch1.1>.

FAO (2003). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Review of the state of the world agriculture. FAO Fisheries Circular 886. FAO, Rome

FAO, (2009). Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007 FAO yearbook. Fishery and aquaculture statistics. <http://www.fao.org/fishery/publications/yearbooks/en>.

FAO, (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018 FAO yearbook. Sistema de información sobre alimentos y recursos fertilizantes para la Acuicultura. <http://www.fao.org/fishery/affris/perfiles-de-las-especies/nile-tilapia/formulacion-y-preparacion-produccion-de-alimentos/es/>

Fasakin, E.A., Balogun, A.M., Fasuru, B.E. (1999). Use of duckweed, *Spirodelapolyrrhiza* L. Schleiden, as a protein, feedstuff in practical diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquac Res* 30:313–318

Fry, G., Iles, T.D., (1972). The Cichlid Fishes of the Great Lakes of Africa: Their Biology and Evolution. Oliver & Boyd, Edinburgh.

Gatlin, D. M., III. (2003). Use of soybean meal in the diets of omnivorous freshwater fish. United Soybean Board and American soybean Association, St. Louis, Missouri, USA. 12 Pages.

Gatlin, D. M., Barrows, III, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. ., Herman, E., Hu, G. ., Kroghal, A° ., Elson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonderg, D., Souza, E. J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products n aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38:551–579.

Getachew, T., (1987). A study of an herbivorous fish, *Oreochromis niloticus* L., diet and its quality in two Ethiopian Rift Valley lakes, Awasa and Zwai. *J. Fish Biol.* 30, 439–449.

Gophen, M., Drenner, R.W., Vinyard, G.L. (1983). Cichlid stocking and the decline of the Galilee Saint Peter's fish (*Sarotherodon galilaeus*) in lake Kinneret, Israel. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 40, 983– 986.

Gophen, M. (1980). Food sources, feeding behavior and growth of *Sarotherodon galilaeus* (Linnaeus) fingerlings. *Aquaculture* 20, 101–115.

Green, B.W. (2006). Tilapia fingerling production systems. pp 181–210. In: C. Lim, C. Webster (Eds). *Tilapias: Biology, Culture, and Nutrition*. Food Products Press. Binghamton, NY

Grimm, H., Tibell, A., Norrlind, B., Blecher, C., Wilker, S. & Schwemmler, K. (1994) Immunoregulation by parenteral lipids: impact of the n-3 to n-6 fatty acid ratio. *JPEN-Parenter. Enter.*, 18, 417–421.

Goda, A. M. A.-S., Wafa, M. E., El-Haroum, E. R., Chowdhury, M. A. K. (2007). Growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) and tilapia galilae *Sarotherodon galilaeus* (Linnaeus, 1758) fingerlings fed plant protein-based diets. *Aquaculture Research* 38:827–837.

Gonzales, J. M., Huston, A. H., Rosinski, M. E., Wu, Y. V., Powless, T. F., Brown, P. B. (2007). Evaluation of fish meal-free diets or first feeding Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture* 19:89–99.

Hernández, C., Olvera-Novoa, M. A., Hardy, R. W., Hermosillo, A., Reyes, C., González, B. (2010). Complete replacement of fish meal by porcine and poultry by-

product meals in practical diets for fingerling Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: digestibility and growth performance. *Aquaculture Nutrition* 16:54–60.

Lim, C., M. M. Barros, P. H. Klesius, and C. A. Shoemaker. (2000). Thiamin requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. p 201 In: Book of Abstracts. Aquaculture America 2000, New Orleans, Louisiana. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society.

Japanese Fisheries agency, (1995). Report on a Survey of Fish Cultural Measures. Japanese Fisheries Agency, Tokyo. 312 pp.

Jauncey, K., Tacon, A. G. J., Jackson, A. J. (1983). The quantitative essential amino acid requirements of *Oreochromis (Sarotherodon) mossambicus*. pp. 328–337. In: L. Fishelson and Z. Yaron (eds) International Symposium on Tilapia in Aquaculture (1st Proceedings, Nazareth, Israel), Tel Aviv University, Israel.

Jauncey, K. (2000). Nutritional requirements. P. 327–375. In: M. C. M. Beveridge and B. J. McAndrew (eds.) *Tilapias: Biology and Exploitation*, Fish and Fisheries Series 25, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Krienitz, L., Dominik, H., Stich, HB., Weiler, W., (2000). *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* (2000) Volume 39 (3), 219-227.

Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois, N., (2008). Calero. Biofuels from microalgae, *Biotechnol. Progr.* 24, 815–820.

Lu, J., Takeuchi, T., (2003). Spawning and egg quality of tilapia, *Oreochromis niloticus* fed solely on raw *Spirulina* throughout three generations. *Aquaculture* 234, 625– 640.

Lu, J., Takeuchi, T., Satoh, H., (2004). Ingestion and assimilation of three species of freshwater algae by larval tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 238, 437-449-

Magid, A., Babiker. M. M. (1975). Oxygen consumption and respiratory behaviour of three Nile fishes. *Hydrobiologia* 46: 359–367.

Mires, D. (1995). The tilapias. In: *Production of Aquatic Animals: Fishes* (eds Nash, C. E., and A. J. Novotny. Elsevier, New York, pp. 133–152.

- McDonald, M.E. (1985). Carbon budgets for a phytoplanktivorous fish fed three different unialgal populations. *Oecologia* 66, 246– 249.
- McDonald, M.E. (1987). Interaction between a phytoplanktivorous fish, *Oreochromis niloticus* and two unialgal forage population. *Environ. Biol. Fishes* 18, 229– 234.
- Markovits, A., R., Conejeros, L., Lopez, M. L. (1992). Evaluation of Marine Microalga *Nannochloropsis* sp. As A Potential Dietary Supplement Chemical, Nutritional and Short Term Toxicological Evaluation in Rats. *Nutr. Res.* 12:1273-1284
- Mbahinzireki, G. B., Dabrowski, K., Lee, K.-J., El- Said, D., Wisner, E. R. (2001). Growth, feed utilization and body composition of tilapia (*Oreochromis* sp) fed with cottonseed meal-based diets in a recirculating system. *Aquaculture Nutrition* 7:189– 200.
- Moriarty, C.M., Moriarty, D.J.W. (1973). Quantitative estimation of the daily ingestion of phytoplankton by *Tilapia nilotica* and *Haplochromis nigripinnis* in Lake George, Uganda. *J. Zool., Lond.* 171, 209– 255.
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.*, 12, 527–534.
- Mustafa, M. G., Nakagawa, H., (1995). A review dietary benefits of algae as an additive in fish feed. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 47, 155–162.
- Nakagawa, H., Montgomery, W. L. (2007). Algae. In: H. Nakagawa, M. Sato, Gatlin III D. M. (eds), *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. Cabi International, Cambridge, USA, pp. 133–167.
- Nandeesh M.C., Gangadhara B., Varghese T.J., Keshavanath P. (1998). Effect of feeding *Spirulina platensis* on the growth, proximate composition and organoleptic quality of common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Research* 29, 305–312.
- Naylor R.L., Hardy R.W., Bureau D.P., Chiu A., Elliott M., Farrell A.P., Forster I., Gatlin D.M., Goldberg R.J., Hua K., Nichols P.D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 15103–15110.

Nguyen, T. N., Davis, D. A., Saoud, I. P. (2009). Evaluation of alternative protein sources to replace fish meal in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 40:113–121.

Nichols, D. S. (2003). Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiol. Lett.*, 219, 1–7.

Northcott, M.E., Beveridge, M.C.M. (1988). The development and structure of the pharyngeal apparatus associated with filter feeding in tilapias (*Oreochromis niloticus* L.). *J. Zool., Lond.* 215, 133–149.

Northcott, M.E., Beveridge, M.C.M., Ross, L.G. (1991). A laboratory investigation of the filtration and ingestion rates of tilapia *Oreochromis niloticus* feeding on two species of blue-green algae. *Environ. Biol. Fishes* 31, 75– 85.

Ogunji, J.O. (2004). Alternative protein sources in diets for farmed tilapia. *Nutr Abstracts and Reviews* 74(8): 23-32.

Olvera-Novoa, M. A., Dominguez-Cen, L. J., Olivera-Castillo, L. (1998). Effect of the use of the microalga *Spirulina Maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Acuaquulture*, 29:709-715.

Otero, A., García, D., Fabregas, J. (1997). Factors controlling eico-sapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9: 465-469.

Paiva, C.M., Freitas, J.V., Tavares, J.R. y Magnusson, H. (1991). Racoos para Piscicultura intensiva no Nordeste do Brasil. *Boletín Téc. DNOCS, Fortaleza*, 29 (2): 61-89.

Park, J., R. Craggs, and A. Shilton. (2011a). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102: 35-42.

Park, J., R. Craggs, and A. Shilton. (2011b). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water Research* 45: 6637-6649.

Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G., Olsen, Y. (1997). A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155, 207–221.

- Renaud, S. M., Tinh, LV., Lambrinidis, G., Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195–214.
- Redner, B. D., R. R. Stickney. (1979). Acclimation to ammonia by *Tilapia aurea*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 108: 383–388.
- Robinson, R.L., Turner, G.F., Grimm, A.S., Pitcher, T.J., (1995). An experimental study of phytoplankton feeding in three tilapiine cichlids. *J. Fish Biol.* 46, 449– 459.
- Ross, L. G. (2000). Environmental physiology and energetics. pp. 89–128. In: M. C. M. Beveridge and B. J. McAndrew (eds.) *Tilapias: Biology and Exploitation*, Fish and Fisheries Series 25, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A., Millington, K.J. (2004). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.*, 17, 449–459.
- Saleh, G., Eleraku, W., Gropp, J. M. (1995). A short note on the effects of vitamin A hypervitaminosis on health and growth of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Ichthyol.* 11: 382–385.
- Saha, S., R. Roy, N., Sen, S. K., Ray, A. K. (2006). Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Aquaculture Research*. 37: 380–388.
- Sanderson, S.L., Stebar, M.C., Ackerman, K.L., Jones, S.H., Batjakas, I.E., Kauffman, L., (1996). Mucus entrapment of particles by a suspension-feeding tilapia (Pisces: Cichlidae). *J. Exp. Biol.* 199, 1743– 1756.
- Sarig, S. (1969). Winter storage of tilapia. *FAO Fish Culture Bulletin*. 2: 8–9.
- Satoh, S., T. Takeuchi, T., Watanabe. (1987). Requirement of Tilapia for α -tocopherol. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 53: 119–124.
- Schulz, C., Wickert M., Kijora, C. Ogundi, J., Rennert, B. (2007). Evaluation of pea protein isolate as alternative protein source in diets for juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research* 38:537–545.

Scott EP, Weiss Ch, Schwarz T, Innis Ch. (2009). Anesthesia, diagnostic imaging and surgery of fish. *Comp Cont Educ Pract* 31: E1-E9.

Shiau, S.Y., Haung, S. L. (1990). Influence of varying energy levels with two protein concentration in diets for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) reared in sea water. *Aquaculture*. 91: 143–152.

Shiau, S. Y., Hsieh, H. L. (1997). Vitamin B6 requirements of tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* fed two dietary protein concentrations. *Fish. Sci.* 63: 1002–1007.

Siddiqui, A. Q., Howlander, M. S., Adam, A. A. (1988). Effects of dietary protein levels on growth, diet conversion and protein utilization in fry and young Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 70: 63–70.

Silva, A.B., da Melo, F.R., Lovshin, L.L. (1989). Observacoes preliminares sobre a cultura monossexo da *Tilapia niloticalinnaeus* (macho) em viveiro, em comparacao com híbridos machos de *Tilapia*, como uso de racao suplementar e fertilizantes. Fortaleza DNOCS, 1975p.

Silverira N. (1993). El estado actual de alimentación y la nutrición en la acuicultura de Brasil Sur. En *La Nutrición y la Alimentación en la Acuicultura de la América Latina y el Caribe*, FAO, Proyecto Aquila II, GCP/RLA/102/ITA, Doc. de Campo (9), México:25-29.

Sørensen, M. N., Stjepanovic, O. H., Romarheim, T., Storebakken, T. (2009) Soybean meal improves the physical quality of extruded fish feed. *Animal Feed Science and Technology* 149: 149–161.

Sosa, IDLAB., Adillo, MDLG., Ibanez, AL., Figueroa, JLIA. (2005). Variability of tilapia (*Oreochromis* spp.) introduced in Mexico: Morphometric, meristic and genetic characters. *J App. Ichthol* 20: 7-10.

Spataru, P., Zorn, M. (1978). Food and feeding habits of *Tilapia aurea* Steindachner in Lake Kinneret (Israel). *Aquaculture* 13, 67–69.

Spolaore, P., Joannis Cassan, C., Duran, E., Isambet, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *J Biosci Bioeng* 101(2):87– 96

- Tacon, A.G., Metian, M. (2013). Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Rev. Fish. Sci.*, 21, 22–38.
- Teshima, S. I., Kanazawa, A., Sakimoto, M. (1982). Essential fatty acids of (*Tilapia nilotica*). *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 31: 201–204.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Uchiyama, Y. (1985). Optimum protein levels in casein-gelatin diets for *Tilapia nilotica* fingerlings. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 34: 45–52.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.*, 1, 10–57.
- Twibell, R. G., Brown, P. B. (1998). Optimal dietary protein concentration for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) fed all-plant diets. *J. World Aquacult. Soc.* 29: 9–16.
- Winfree, R. A., Stickney, R. R. (1981). Effects of dietary protein and energy on growth, feed conversion efficiency and body composition of *Tilapia aurea*. *J. Nutr.* 111: 1001–1012.
- Yada, Y. (1982). Study on the feeding habit of *Oreochromis nilotica*: I. The change in feeding habit of *Oreochromis nilotica* in feeding and no feeding pond. *Suisan Zoshoku* 29, 229– 233.
- Yamaguchi, K. (1997). Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *J. Appl. Phycol.*, 8, 487–502.
- Yubin, M., Zhiyao, W., Changjiang, Y., Yehu, Y., Gongke, Z. (2014). Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 167, 503-509.

