

12
20
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

USO DEL NEJAYOTE PARA EL CULTIVO DEL ROTIFERO: *Brachionus calyciflorus* PALLAS BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

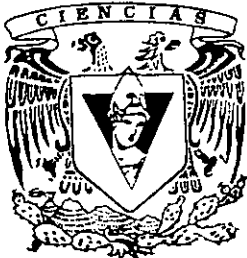
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

RAYMUNDO ALFREDO AREVALO STEVENSON



DIRECTOR DE TESIS: DR. SINGARAJU SRI SUBRAHMANYA SARMA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION DE BOLSAS

1998

263177

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
CIUDAD UNIVERSITARIA**

**Uso del nejayote para el cultivo del rotífero:
Brachionus calyciflorus Pallas
bajo condiciones de laboratorio**

Raymundo Alfredo Arévalo Stevenson



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Uso del nejayote para el cultivo del rotífero: Brachionus calyciflorus Pallas
bajo condiciones de laboratorio.

realizado por

Arévalo Stevenson Raymundo Alfredo
con número de cuenta 8703273-2, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Singaraju Sri Subrahmanya Sarma
Propietario Dr. Javier Alcocer Durán
Propietario Dra. Elva Escobar - Briones
Suplente Dra. Norma Angélica Navarrete Salgado
Suplente Biol. Mario Alfredo Fernández Araiza

Edna M. Suárez D.

Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz

S.S.S. - Sarma
Javier Alcocer Durán
Elva Escobar-Briones
Norma Angélica Navarrete Salgado
Mario Alfredo Fernández Araiza
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICATORIA:

A mis padres Raymundo Arévalo Vázquez y Aurora Stevenson Lázcano por todo su amor, cariño, comprensión, esfuerzo y apoyo, por medio de los cuales me guiaron para alcanzar mis metas, este logro también es de ustedes.

A mis hermanas Mitzu Vanessa, Osnelly Esmeralda y Perla Yazmin por su amor comprensión y cariño en todos los momentos que me han impulsado para poder superarme cada día.

A todas las personas de las que recibí una palabra de aliento para superarme.

MUCHAS GRACIAS

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. S. S. S. Sarma por haber creído, dirigido, y proporcionado la bibliografía de éste trabajo, sin su ayuda, consejo, y amistad que fueron determinantes.

A la Dra. S. Nandini por su apoyo académico y de técnicas que apoyaron la realización de este trabajo.

Al Biólogo Mario Alfredo Fernández Araiza por los comentarios y discusiones usados, sin los cuales el resultado de este trabajo no sería el mismo.

Al Dr. Javier Alcocer Duránd, Dra. Elva Escobar - Briones y Dra. Norma A. Navarrete Salgado por sus valiosas observaciones y sugerencias en la revisión para enriquecer este escrito.

Al acuario de la UNAM Campus Iztacala y a su personal por el apoyo recibido para facilitar la realización de este trabajo.

A mis amigos del acuario de Iztacala en especial a Alejandro Andrade Camacho por brindarme su amistad.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias por haber participado en mi formación académica a los cuales recuerdo con cariño.

A Gabriela, Angelica, Jaina, Maritza, Clara, Elia, Dolores, Nora, Pilar, por ser mis amigos durante la carrera y después de ésta.

A todos ellos mil gracias..

I N D I C E

Antecedentes	8
Resumen	12
 Capítulo 1.	
1.1. Introducción	18
1.2. Hipotesis	19
1.3. Objetivo	19
1.4. Material y método	19
1.5. Resultados	21
1.6. Discusión	21
1.7. Conclusiones	22
1.8. Referencias	23
 Capítulo 2.	
2.1. Introducción	30
2.2. Hipotesis	31
2.3. Objetivo	31
2.4. Material y método	31
2.5. Resultados	32
2.6. Discusión	33
2.7. Conclusiones	35
2.8. Referencias	35
 Capítulo 3.	
3.1. Introducción	43
3.2. Hipotesis	44
3.3. Objetivo	44
3.4. Material y método	44
3.5. Resultados	46
3.6. Discusión	47

3.7. Conclusión	48
3.8. Referencias	50
Conclusiones generales	61
Recomendaciones	62
Apéndice 1	63
Apéndice 2	64
Material y método	65
Resultados	66
Discusión	67
Resultados	67
Referencias	68
Apéndice 3	70

ANTECEDENTES

LA NIXTAMALIZACIÓN

El proceso de la nixtamalización puede describirse como la lixiviación empleando una disolución de hidróxido de calcio, la cual se realiza a temperaturas que varían entre los 80° y 100°C. Este método fue prácticamente desarrollado con la domesticación del maíz en Mesoamérica hace más de seis mil años. Se han hecho numerosos estudios sobre las características del maíz cocido en forma tradicional con cal y se ha encontrado que, aunque la cocción alcalina disminuye el contenido total de proteína del grano, mejora su valor nutricional (Durán de Bazúa, 1988).

El procesamiento ya industrializado del maíz, basado en la nixtamalización, es relativamente reciente (considerando los miles de años del proceso tradicional). Sin embargo las variaciones entre el proceso industrial con el precolombino son mínimas y únicamente abarcan condiciones de cocimiento y reducciones en tiempo y consumo de energía y agua.

A pesar de esto, el consumo de agua sigue siendo considerable y los desechos líquidos fluctúan de 2 a 3 unidades de volumen de agua por cada unidad de masa de granos cocida. Las aguas residuales de la industria de la nixtamalización, conocidas como nejayote (del náhuatl nextli, cenizas de cal; ayoh, caldo o cosa aguada y atl, agua) son consideradas altamente contaminantes, pues se componen de elevadas concentraciones de materia orgánica e inorgánica en forma suspendida y disuelta (hasta 30 g/L), además de que salen del proceso a temperatura y pH elevados (40° a 80°C y a 14 unidades, respectivamente) (Durán de Bazúa, 1987 a,b).

Se considera que para el año 2000, de acuerdo con el Programa Nacional para la Protección del Medio Ambiente (1990-1994), se verterán 207 m³/s de aguas residuales a nivel nacional. Ello implica un reto enorme, no solamente para los servicios de agua potable y alcantarillado, sino también para los sistemas de tratamiento de aguas (INE, 1994).

El sector industrial, de acuerdo con los índices de extracción, consumo y contaminación del agua, se ha configurado en 39 grupos, de los cuales 9 son los que producen la mayor cantidad de aguas residuales: Azúcar, química, papel y celulosa, petróleo, bebidas, textiles, siderurgia, electricidad y alimentos. Estos 9 grupos en conjunto arrojan aproximadamente el 82% del total de aguas residuales de origen industrial. Se destacan las industrias azucarera y química, con el 59.8% del total. En el caso específico de la industria alimentaria en la cual se manejan grandes volúmenes de agua, (para el año de 1988 representó el 22%, de la descarga de aguas residuales correspondientes al sector industrial) también se generan aguas de desecho contaminantes (SARH, 1991).

Actualmente existe la necesidad de producir grandes cantidades de proteína tanto para el consumo humano, como para consumo animal, pues las fuentes convencionales de ésta, no logran una satisfacción completa de la demanda. Esto constituye un verdadero problema, que es muy probable se agudice en la medida de que la población aumente.

La producción de proteína microbiana o proteína unicelular (PUC), que es un alimento proteínico derivado de microorganismos casi todos unicelulares, crecidos en cultivo sumergido en diversas fuentes y desperdicios; ha avanzado considerablemente en los últimos años debido al elevado potencial que tiene como alimento (Pedroza, 1985) informa que la biomasa generada del tratamiento del material disuelto presente en el nejayote puede ser empleada como una fuente no convencional de alimentos. La composición es la siguiente:

PARÁMETRO	CONCENTRACIÓN
Azúcares reductores totales, (mg/L)	2.58
Nitrógeno Kjeldahl, (mgN/L)	291.00
Proteína, (%N x 6.25)	1.84
Fósforo, (mg PO ⁴ /L)	178.00
Relación N : P	1:0.61
Cenizas, (%)	10.20

Grasas, (%)	4.50
DBO, (mg O ₂ /L)	7875.00
DQO, (mg O ₂ /L)	21280.00

Esto surge como una respuesta a la demanda creciente de alimentos, bajos en su costo y producidos a gran escala, aprovechando las ventajas que tiene la producción de microorganismos sobre la de plantas y animales convencionales.

Algunas ventajas son las siguientes (Rodríguez, R. 1996):

Los microorganismos tienen un tiempo de generación relativamente corto

El contenido de proteína obtenido es relativamente alto

La producción de proteína microbiana no depende en general de los cambios climáticos

En cuanto a insumos, sus requerimientos son relativamente bajos y las necesidades de áreas, reducida

Los problemas son pequeños comparados con los que se deben enfrentar en otros procesos para la producción de alimentos.

Viendo las ventajas en cuanto a contenido de nutrientes disueltos en este producto secundario. Se propone que los rotíferos sean cultivados en éste medio, ya que se alimentan de materia orgánica suspendida, y que en las óptimas condiciones tienen una tasa de crecimiento poblacional diario (r) de 1.5 y que pueden ser utilizados como alimento vivo para las larvas de peces y crustáceos

Bibliografía

Durán de Bazúa, C. 1987^a. Reaprovechamiento de efluentes de la industria del maíz. Informe final del proyecto. Impresora Azteca, SA de CV. México, D.F. México.

Durán de Bazúa, C. 1987b. Effuents of the food industry in México. Environmental impacts on soil and water resources and possible solution using the biothenological approach. Case problem: The corn industry. En *Global Bioconversions*, Vol.II, cap 2. Pp 75-119. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, EUA.

Durán de Bazúa, C. 1988. Una nueva tecnología para la extrusión alcalina del maíz y sorgo. Monografía tecnológica No. 2. Eón. Eds. México, D.F. México.

INE. 1994. Programa Nacional para la Protección del Medio Ambiente 1990-1994. Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.

Pedroza, R. 1985. Estudio de la degradación biológica de los efluentes de la nixtamalización. Tesis de maestría. Universidad Iberoamericana. México, D.F. México.

Rodríguez, R. 1996. Aspectos microbiológicos de un reactor de película biológica denominado biocinta. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. México.

SARH. 1991. Programa nacional de aprovechamiento del agua 1991-1994. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Comisión Nacional del Agua, México, D.F. México.

Resumen

El trabajo que se presenta a continuación es la comparación del uso alternativo del nejayote, como alimento para *Brachionus calyciflorus*, en cultivo sustituyendo su alimento tradicional que es el alga *Chlorella vulgaris* haciendo una comparación con las dos dietas viendo como afecta la dinámica poblacional de éste rotífero.

En el contexto actual de interés ambiental se utilizó el agua de desecho de la industria del nixtamalización del maíz (nejayote), ya que contiene nutrientes disueltos, se uso como medio de cultivo de rotíferos, organismos ampliamente utilizados en acuicultura como el primer alimento “ideal” para criar larvas de pez y crustáceos. Los rotíferos son usados también como indicadores del estado trófico del ambiente acuático. En el presente estudio, se comparó el crecimiento poblacional de rotíferos alimentados con nejayote en concentraciones diferentes (2%,4%,8%,16% y 32%) y con el alga (*Chlorella vulgaris* como el control, en una densidad de 2×10^6 cel/ml que se contó con la cámara de Neubauer.

El trabajo se divide en 3 capítulos para que sea más rápida la comprensión y seguimiento del tema en particular. En el capítulo 1, se analiza y compara el crecimiento del rotífero *Brachionus calyciflorus* usando el nejayote, obtenido de una planta nixtamalizadora en la ciudad de México, el cual fue diluido en concentraciones del 2%, 4%, 8%, 16% y 32%, y neutralizado (pH = 7), y el alimento tradicional de la microalga (*Chlorella vulgaris*.

El objetivo fue determinar el efecto de dos dietas diferentes sobre la dinámica poblacional de *B. calyciflorus*, con nejayote solo y con alga *Chlorella vulgaris*. El aumento de la densidad de los rotíferos fue directamente proporcional a la concentración del nejayote y se obtuvo una concentración óptima del 16% dónde la población máxima de rotíferos fue de $(238 \pm 50 \text{ ind. ml}^{-1})$. La tasa de crecimiento poblacional por día (r) varió de 0.355 ± 0.059 a 0.457 ± 0.048 dependiendo de la concentración y combinación del alimento. Los resultados obtenidos indicaron que el nejayote puede sustituir al alimento tradicional del rotífero, (*Chlorella vulgaris*) obteniéndose 3 veces más individuos ml^{-1} .

En el capítulo 2, se analiza el crecimiento poblacional del rotífero *Brachionus calyciflorus* sujeto a 2 condiciones diferentes de temperatura (25°C y 30°C) y 3 concentraciones de alga (1.0×10^6 , 2.0×10^6 y 4.0×10^6 células ml^{-1}). El objetivo fue determinar las mejores condiciones para el desarrollo poblacional óptimo de los rotíferos bajo condiciones de alimentación tradicional. Los resultados mostraron que la densidad poblacional máxima se alcanzó en el día 6 a 30°C, mientras que a 25°C se observaron 2 picos el primero en el día 9 y el segundo en el día 13.

La densidad poblacional más alta se observó en las poblaciones sujetas a temperaturas de 25°C. A 30°C, los valores de (r) en las densidades de 1, 2 y 4×10^6 células ml^{-1} de alga fueron 38 ± 4 , 45 ± 5 y 85 ± 5 , respectivamente; mientras que a 25°C los valores de (r) fueron 104 ± 5 , 110 ± 14 y 97 ± 13 para las mismas densidades. Los valores de temperatura y concentración de alimento tuvieron un impacto significativo en la densidad poblacional máxima alcanzada y el tiempo que tomó para alcanzar la tasa de crecimiento diario promedio. Con base en los resultados se decidió manejar la cepa de *B. calyciflorus* a una temperatura de 25°C, obteniendo un mejor crecimiento poblacional y durante más días que a 30°C con la misma densidad de alimento.

En el capítulo 3, se describe el análisis de la calidad nutricional relativa de *B. calyciflorus* cultivado en las condiciones experimentales mencionadas en el capítulo uno (*Chlorella vulgaris*, 25°C). Para este propósito, se escogió como organismo prueba al rotífero depredador *Asplanchna sieboldi*. El objetivo fue evaluar la calidad nutricional de *B. calyciflorus* alimentado con nejayote, nejayote más alga y solamente alga como el control, a través de evaluar la dinámica poblacional del rotífero depredador *A. sieboldi*. Las curvas de crecimiento poblacional de *A. sieboldi* en diferentes concentraciones de presa (2.5, 5, 10 y 20 individuos/ $\text{ml}/24\text{hr}$) alimentadas con las opciones *C. vulgaris*, nejayote ó su mezcla, muestra oscilaciones en la abundancia. En general la abundancia de *A. sieboldi* alimentado con presas que se alimentaron con nejayote fue significativamente alta; comparada con aquellos alimentados con presas que se alimentaron de alga ó alga más nejayote, lo que implica una mejor calidad nutricional de los rotíferos en éstas condiciones de cultivo a pesar de haber tenido el tamaño del cuerpo más pequeño ($6.24 \times$

$10^5 \mu\text{m}^3$) comparado con la población de *B. calyciflorus* que se alimentó con algas y tuvo el tamaño más grande ($7.98 \times 10^5 \mu\text{m}^3$).

En los resultados se muestra que la tasa de crecimiento poblacional más alta fue 0.95 ± 0.01 y la más baja fue 0.33 ± 0.04 para *A. sieboldi* alimentado con *B. calyciflorus* cultivado con nejayote y con nejayote más alga, respectivamente. Cuando los individuos de *A. sieboldi* fueron alimentados solamente con algas, algas + nejayote ó nejayote, no hubo reproducción lo que indica que cuando se alimentaban con éstas dietas solo obtenían energía para vivir pero no para reproducirse.

Este estudio indica que el agua residual de la industria de la nixtamalización del maíz para hacer tortillas (nejayote), rica en materia orgánica, es adecuado para el cultivo en masa de rotíferos. Además los experimentos con *A. sieboldi* muestran que la calidad nutricional de los braquiiónidos cultivados en el nejayote es mejor, a los que se cultivan convencionalmente con alga.

En el apéndice 1 se describe el método utilizado para el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*. El objetivo fue establecer la máxima densidad del alga que puede obtenerse en laboratorio para ser utilizada como alimento para los rotíferos. Se analiza el modelo de crecimiento, obteniéndose una densidad máxima promedio de $50.72 \times 10^6 \pm 5.89 \times 10^6$ células ml^{-1} en el día 16.

En el apéndice 1, se describe brevemente como hacer una población clonal de rotíferos.

En el apéndice 2, se muestra la gráfica del crecimiento poblacional del alga.

La hipótesis general del trabajo es la siguiente:

El nejayote es rico en materia orgánica de la cual se pueden alimentar los rotíferos, por lo cual, se puede obtener de ésta biomasa rica en nutrientes y a un bajo costo.

Con base en lo anterior se plantearon los siguientes objetivos.

1. Utilizar el nejayote para el cultivo del rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas sustituyendo el alimento tradicional utilizado en cultivo *Chlorella vulgaris*, determinando que efecto tiene sobre la dinámica poblacional, haciendo una comparación entre las dos dietas.
2. Determinar las mejores condiciones para el desarrollo poblacional óptimo del rotífero *Brachionus calyciflorus* sujeto a 2 temperatura diferentes y usando 3 concentraciones de *Chlorella vulgaris*.
3. Evaluar la calidad nutricional del rotífero *Brachionus calyciflorus* usado como presa, alimentado a su vez con nejayote, nejayote y alga, observando como afecta la dinámica poblacional del rotífero depredador *Asplanchna sieboldi* comparado con los rotíferos que se alimentan solamente con alga.

BENEFICIOS:

Los rotíferos se alimentan de la materia orgánica que contiene el nejayote, pudiendo utilizarse el nejayote para obtener biomasa rica en nutrientes y a bajo costo. Además se reduce la carga de materia orgánica del nejayote y, por lo tanto, contamina menos los cuerpos acuáticos receptores. Los rotíferos alimentados del nejayote son más nutritivos que los que se alimentan de alga *Chlorella vulgaris*.

Use of *nejayote* for the culture of rotifers: laboratory growth experiments on *Brachionus calyciflorus* Pallas

Summary

The use of food processing industrial wastewaters for the growth of rotifers was attempted in this study. In the present context of environmental concern, harvesting of

wastes for the production of usable biomass is rewarding. *Tortilla* industry being one of the most important in the food processing sector, I used the wastewater for the growth of freshwater zooplankton (Rotifers). Rotifers are widely used as ideal first food for rearing larval fish and crustaceans in aquaculture. They are also used as indicators of the state of aquatic environment. In the present investigation, I studied the rotifer growth in relation to the concentration of Nejayote water.

The work was divided into 3 chapters. In the Chapter 1, I attempted to culture rotifers (*Brachionus calyciflorus*) using the waste water from Mexico's largest food processing industrial sector based on maize. Waste water in original concentration did not support rotifers. However, when diluted to 5 concentrations (ranging from 2% to 32% and pH adjusted to 7.0), rotifer density increased with increasing concentration of waste water. Green algae (at constant density of 2×10^6 cells ml^{-1} of *Chlorella*) in combination with waste water resulted in a higher abundance of rotifers only at higher concentrations (above 8%) of waste water. The maximum peak density of rotifers (238 ± 50 ind. ml^{-1}) was obtained at 16% dilution of waste water and with addition of *Chlorella*. The rate of population increase per day (r) (mean \pm SD) varied from 0.355 ± 0.059 to 0.457 ± 0.048 depending on food combination and concentration.

In the Chapter 2, I analysed the population growth of the rotifer *Brachionus calyciflorus* subjected to different conditions of temperature (25 °C and 30 °C) and algal concentration (namely, 1.0×10^6 , 2.0×10^6 and 4.0×10^6 cells ml^{-1}). I found that peak population densities were reached at around day 6 at 30 °C but between day 9 to 13 at 25°C. The lowest r value recorded in the study was 0.30 ± 0.03 at a food concentration of 1×10^6 cells ml^{-1} at 25 °C and the highest population growth rate (0.47 ± 0.01) at a food concentration of 4×10^6 cells ml^{-1} at 25 °C. Both temperature and food concentration had a significant impact on the maximum population density reached, the time taken to reach the average peak abundance or the rate of growth per day (r).

In the Chapter 3, I studied the nutritional quality of waste-water grown *B. calyciflorus* using a predatory rotifer. The nutritional quality of prey rotifer *Brachionus calyciflorus* grown on two types and three combinations of food was tested using the predatory species *Asplanchna sieboldi*. *B. calyciflorus* was grown using *Chlorella vulgarens*, diluted and pH-adjusted waste water from *tortilla* industry (*agua de nejayote*)

and their mixture. The smallest sized adults ($6.24 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) were observed in *B. calyciflorus* populations grown in *nejayote* water while the largest individuals ($7.98 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) were obtained from those fed on algae. The body size of brachionids raised on the mixture of alga and *nejayote* water showed intermediate results. Population growth curves of *A. sieboldi* grown on different prey combinations (algae vs *nejayote* water and their mixture) and densities (2.5-20 prey/ml/24 hr) showed oscillations in predators' abundance. In general, there was a significantly higher abundance of *Asplanchna* fed on prey grown in *agua de nejayote* as compared to those fed on either only algae or algae plus *agua de nejayote*. A consistently higher population growth in *A. sieboldi* fed on *B. calyciflorus* raised on *nejayote* water probably implied better nutritional quality of prey rotifers, despite their smaller body size. The highest population growth rate recorded in the study was 0.95 ± 0.01 and the lowest was 0.33 ± 0.04 for *A. sieboldi* fed on *B. calyciflorus* grown on *nejayote* water and *nejayote* water plus algae, respectively. When *A. sieboldi* individuals were maintained (in the absence of prey brachionids) in algae, algae+*nejayote* water or *nejayote* water alone, no reproduction occurred, although the asplanchnids continued to live for a few more days in medium with *nejayote* water with or without addition of algae.

This study suggests that wastewater from the *tortilla* industry (*agua de nejayote*) can be used for mass culturing rotifers. From the feeding studies using *Asplanchna* it is evident that the nutritional quality of the brachionids raised on wastewater is comparable to those conventionally raised on algae.

In the appendix 1, I described the methods of culturing clonal population of rotifers. In the appendix 2, the growth patterns of the microalgae *Chlorella vulgaris* were included.

CAPITULO I

Dinámica poblacional de *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera: Monogononta; Brachionidae) alimentado con nejayote.

1.1 INTRODUCCIÓN

El maíz y particularmente la tortilla, es uno de los componentes importantes en la dieta de la población mexicana. Los niveles de consumo de la industria tortillera son a gran escala, por arriba de las 50 toneladas por día. En una industria casera se tiene un nivel de producción de alrededor de los 700 kilogramos diarios (Durán de Bazúa, 1988). Más del 95% de la industria tortillera en México utiliza maíz y el resto utiliza trigo, para preparar la tortilla por el método tradicional llamado nixtamalización (cal-escarpamiento del maíz), las semillas de maíz son cocidas en agua con cal viva (CaCO_3). Este proceso hidroliza la dura cubierta de la semilla y hace que las semillas sean fácilmente maleables, aplastando el material para formar masa y manufacturar las tortillas. Durante el proceso de cocción, un número de sustancias importantes en forma de partículas orgánicas, que incluyen proteínas, carbohidratos y lípidos se disuelven en el agua, dando como resultado un rico medio orgánico (Pedroza, 1985).

Los rotíferos se alimentan directamente de la materia orgánica disponible (Pourriot, 1965), y de bacterias y protozoarios (Arndt, 1993). Los rotíferos forman un importante eslabón en la cadena alimenticia acuática, particularmente en la transferencia de energía de un nivel trófico inferior a otro superior. En numerosos trabajos se ha obtenido una producción alta de rotíferos (arriba de 500 individuos ml^{-1}) utilizando los residuos de porquerizas y otros residuos de sustancias orgánicas para alimentar a los rotíferos (Jhingran, 1991). Ya que el nejayote es rico en materia orgánica disuelta y no es tóxico, en este estudio se propuso su uso para que los rotíferos se alimentaran de ésta materia orgánica que contiene, obteniendo de esta forma biomasa rica en nutrientes y a bajo costo.

1.2. HIPÓTESIS

Como el nejayote es rico en materia orgánica disuelta, puede ser utilizado como alimento alternativo para sustituir el alimento tradicional que es el alga *Chlorella vulgaris*.

1.3. OBJETIVO

Utilizar el nejayote para el cultivo del rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas sustituyendo su alimento tradicional *Chlorella vulgaris*, y al ver el efecto que tiene éste sobre la dinámica poblacional, mediante una comparación entre las dos dietas.

1.4. MATERIAL Y MÉTODO

En este trabajo se usaron poblaciones clonales (Apéndice 1) de *Brachionus calyciflorus* aislados de estanques de plástico del acuario UNAM campus Iztacala, los cuales se alimentaron con nejayote y con el alga *C. vulgaris* en medio EPA (Anónimo, 1985) a una densidad de 2×10^6 células ml^{-1} (ésta concentración se obtuvo en otro experimento que se menciona en el capítulo 2 determinándose como la concentración ideal). El nejayote, fue obtenido directamente de un molino de nixtamal de la ciudad de México el cual emite diariamente una carga constante de nejayote al drenaje.

Cada tercer día se colectaron 2 litros de nejayote, y se almacenaron en el refrigerador a 4°C, utilizándolo para desarrollar los experimentos que se llevaron a cabo diariamente.

El pH inicial del nejayote como se obtiene del molino fue de 9.0 debido a los niveles altos de carbonato de calcio utilizados en el proceso de nixtamalización. Este valor elevado de pH no permite el crecimiento de los rotíferos (Mitchel y Joubert, 1986), por lo que se neutralizó agregando 1 ml de HCl al 38% por litro de nejayote. Precipitándose en este proceso el calcio, el cual se elimina filtrando el nejayote con una malla de 20 μ . En un bioensayo anterior a éste trabajo, se observó que *B. calyciflorus* no crece en el nejayote en la concentración con que se obtiene del molino, por lo cual se

diluyó éste. en las concentraciones del 100%, 75%, 50%, y 25%, solo sobrevivieron algunos en la concentración del 25%, por lo que se realizó otra dilución del nejayote en 5 concentraciones: 32%, 16%, 8%, 4%, y 2% a las cuales la sobrevivencia de *B. calyciflorus* fue mayor.

Para el experimento se usaron recipientes transparentes con capacidad de 25 ml lavados y desinfectados. Se utilizaron 6 tratamientos, 5 experimentales que consisten en la alimentación con nejayote en las concentraciones del 2%, 4%, 8%, 16% y 32%, y el control en el que se utilizó *C. vulgaris* a una concentración de 2×10^6 células ml^{-1} , cada uno de ellos por triplicado. El experimento se llevó a cabo a una temperatura de 25°C, controlada dentro de un acuario con un termostato, a pH neutro y fotoperiodo constante. Para mantener las partículas alimenticias suspendidas y facilitar la alimentación del rotífero se puso aireación a los recipientes experimentales. Dentro de cada recipiente de prueba, se introdujo *B. calyciflorus* en una densidad de 1 individuo ml^{-1} para observar el incremento poblacional diario de los rotíferos alimentado con dietas alternativas.

El conteo de rotíferos, se realizó de la siguiente manera :

- a) conteo individual cuando la densidad de rotíferos era menos de 5 individuos ml^{-1} ó
- b) conteo por alicuotas de 1-5 ml^{-1} cuando la densidades eran mayores 5 individuos ml^{-1} .

La densidad poblacional se estimó diariamente con el uso de un microscopio estereoscópico, contando individualmente a los rotíferos colocándolos en un recipiente de acrílico, separándolos con un pipeta Pasteur y depositándolos en un recipiente limpio con medio fresco. El conteo se hizo para cada una de las réplicas tomando, al menos 3. alicuotas con una pipeta graduada de 1 ml, hasta que la mayoría de las réplicas completara un ciclo poblacional, y obteniendo la curva poblacional de su crecimiento.

Para estimar la densidad poblacional se contaron sólo los rotíferos vivos durante el periodo que duró el experimento. La densidad poblacional de los rotíferos es expresada en número de individuos por mililitro. Para estimar la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) de los rotíferos se utilizó la siguiente fórmula:

$$r = (\ln N_t - \ln N_0)/t$$

dónde

N_0 = densidad poblacional inicial

N_t = densidad poblacional después del tiempo t.

t = tiempo en días

1.5. RESULTADOS

Los rotíferos se alimentaron de la materia orgánica contenida en el nejayote, obteniendo que la densidad poblacional de *Brachionus calyciflorus* tuvo un incremento directamente proporcional con la concentración del nejayote. Comparado con el alga donde se muestra que el incremento de la población fue menor (Figs 1 y 2). En la concentración del nejayote al 2% la densidad poblacional máxima fue de 40 ± 2 individuos ml^{-1} . En la concentración del nejayote al 4% la densidad poblacional máxima fue de 60 ± 3 individuos ml^{-1} . En la concentración del nejayote al 8% se da una densidad poblacional máxima de 117 ± 3 individuos ml^{-1} . El pico más alto de densidad poblacional máximo de los rotíferos fue de 241 ± 48 individuos ml^{-1} que se observó a una dilución al 16% del nejayote (Fig 3), demostrando que éste desecho tiene un impacto positivo en el crecimiento poblacional. La tasa intrínseca de crecimiento poblacional diario (r) varía desde 0.355 ± 0.059 a 0.457 ± 0.048 dependiendo de la concentración de alimento (Fig 4). Así, haciendo una comparación, cuando la concentración del nejayote fue del 8%, la densidad de rotíferos obtenida fue de 117 ± 3 individuos ml^{-1} , demostrando que el alga puede ser sustituida exitosamente, como alimento tradicional en una concentración de 2×10^6 células ml^{-1} donde se obtuvo una densidad de 80 ± 2 individuos ml^{-1} . A una concentración del 32% los rotíferos tienen un crecimiento poblacional pobre siendo su máxima densidad poblacional 40 individuos ml^{-1} demostrando que una concentración mayor de nejayote a ésta no pueden sobrevivir los organismos.

1.6. DISCUSIÓN

En este estudio se confirmó el uso por parte de los rotíferos de la materia orgánica disuelta en el nejayote, ya que al observarse el nejayote en cada una de las concentraciones directamente debajo de un microscopio estereoscópico a un aumento de

(1-3 x 10) y en un microscopio óptico en un aumento de (10 x 10) no se detectó la presencia de protozoarios, que podrían haber utilizado la materia orgánica. El uso del nejayote en su concentración original, no es recomendable para alimentar a los rotíferos, ya que la alta concentración de partículas de materia orgánica saturan el aparato digestivo de los rotíferos y por lo tanto hace deficiente la alimentación (Downing y Rigler 1894). Esto es evidente en la figura 3, en la cual se muestra que, cuando la concentración del nejayote fue del 32%, los rotíferos mantenían una densidad poblacional baja con un máximo de 40 individuos ml⁻¹.

La densidad poblacional de *Brachionus calyciflorus* obtenida, indica que el nejayote en una concentración del 8% tiene una carga orgánica utilizable, comparable al 2 x 10⁶ células ml⁻¹ de la biomasa de *C. vulgaris*; en términos de peso seco, el nejayote al 8% equivale a aproximadamente a 28.4 µg ml⁻¹; demostrando que un leve incremento en la concentración del nejayote, por ejemplo al 16%, resulta en la prolongación de la fase logarítmica, después de la cual los rotíferos crecieron 3 veces más que en el control. Esto implica que el nejayote no diluido, contiene fácilmente la cantidad de materia orgánica utilizable de 355mg l⁻¹ que tiene un potencial que da como resultado una producción de rotíferos de alrededor de 1,000 individuos ml⁻¹. La producción de rotíferos a esta densidad no es común bajo condiciones de trabajo en el campo. Por ejemplo, las aguas de porquerizas y el estiércol de corral, utilizados en los tanques de peces para alimentar a los rotíferos dan una densidad comparable a esta densidad de individuos (Jhingran, 1991).

1.7. CONCLUSIONES

La tasa de crecimiento poblacional en los rotíferos, observado aquí en las 2 combinaciones de alimento y 5 densidades es comparable con los rangos conocidos para esta especie. Por ejemplo, Sarma *et al.*, (1997) tiene registrado los valores de r de esta especie en rangos que varían de 0.2 - 0.8 dependiendo de la concentración de alimento y la densidad de inoculación; en raras ocasiones, el valor de r de esta especie excede 2.0 (Bennett & Borass, 1989).

Con los resultados de este estudio se sugiere la utilización del nejayote para la producción de rotíferos, porque es mejor que el alga, para su desarrollo. Estos rotíferos

pueden ser utilizados en la acuicultura, para criar larvas de peces y crustáceos. Puesto que la calidad nutricional del nejayote no tienen cambios significativos en su colecta de una localidad a otra (Pedroza, 1985), estos resultados pueden ser aplicados para el nejayote colectado de otros sitios y así ya no sea una fuente de contaminación para los cuerpos de agua que reciben las emanaciones que emiten los molinos de nixtamal a los drenajes. Este experimento, puede formar el comienzo de otros estudios, tales como aquellos de la influencia en la producción de rotíferos en aspectos nutricionales usando el nejayote como el suplemento del alimento, en este caso el alga *C. vulgaris*.

1.8. REFERENCIAS

Anónimo. 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. US Environment Protection Agency. EPA/600/4-85/013.

Arndt, H. 1993. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates): A review. *Hydrobiologia*. 255/256: 231-246.

ASTM. 1991. Standard guide for acute toxicity tests with the rotifer *Brachionus*. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 11.04, E1440, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA.

Bennett, W. N. & M. E. Borass. 1989. A demographic profile of the fastest growing metazoan: a strain of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Oikos*. 55: 365-369.

Downing, J. A. & F. H. Rigler, (eds.). 1984. A manual on methods for the assessment of secondary productivity in freshwaters. Blackwell Scientific Publ., Oxford, 501 pp.

Durán de Bazúa, C. 1988. Una nueva tecnología para la extrusión alcalina de maíz y sorgo. Monografía Tecnológica 2. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico D. F., 71 pp.

Jhingran, V.G. 1991. Fish and fisheries of India. 3rd ed. Hindustan Publ., Corp., New Delhi, India. 727 pp.

Lubzens, E., A. Tandler & G. Minkoff. 1989. Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia*. 186/187: 387-400.

Mitchell, S.A., & H. B. Joubert. 1986. The effect of elevated pH on the survival and reproduction of *Brachionus calyciflorus*. *Aquaculture*. 55: 215-220.

Pedroza, R. 1985. Estudio de la degradación biológica de los efluentes de la nixtamalización. Tesis de maestría, Universidad Iberoamericana. México D.F., Mexico.

Pourriot, R. 1965. Recherches sur l'écologie des Rotiferes. *Vie et Milieu (Suppl.)*. 21: 1-224.

Sarma, S.S.S., M. A. F. Araiza & R. J. A. López 1997. Influence of food concentration and inoculation density on the population growth of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera). *Environment & Ecology* 15: 435-441.

Sladeczek, V. 1983. Rotifers as indicators of water quality. *Hydrobiologia* 100: 169-201.

Snell, T. W. & C.R. Janssen. 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia*. 313/314: 231-247.

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA) de las variables de selección poblacional en *B. calyciflorus*, el crecimiento en relación a diferentes concentraciones de nejayote y con y sin adición del alga como recurso alimenticio.

Variable poblacional	Parámetro	df	SS	MS	tiempo F	P
Densidad Poblacional Máxima						
	Combinación Alimento (F)	de 1	16100	16100	19.75	0.001
	Concentración agua residual (W)	de 4	56274	14068	17.26	0.001
	Interacción (F x W)	4	36085	9021	11.07	0.001
	Error	20	16302	815		
Tasa de crecimiento poblacional (r)						
	Combinación Alimento (F)	de 1	0.196	0.20	47.10	0.001
	Concentración agua residual (W)	de 5	0.417	0.08	16.71	0.001
	Interacción (F x W)	5	0.184	0.04	7.37	0.001
	Error	24	0.100	0.004		

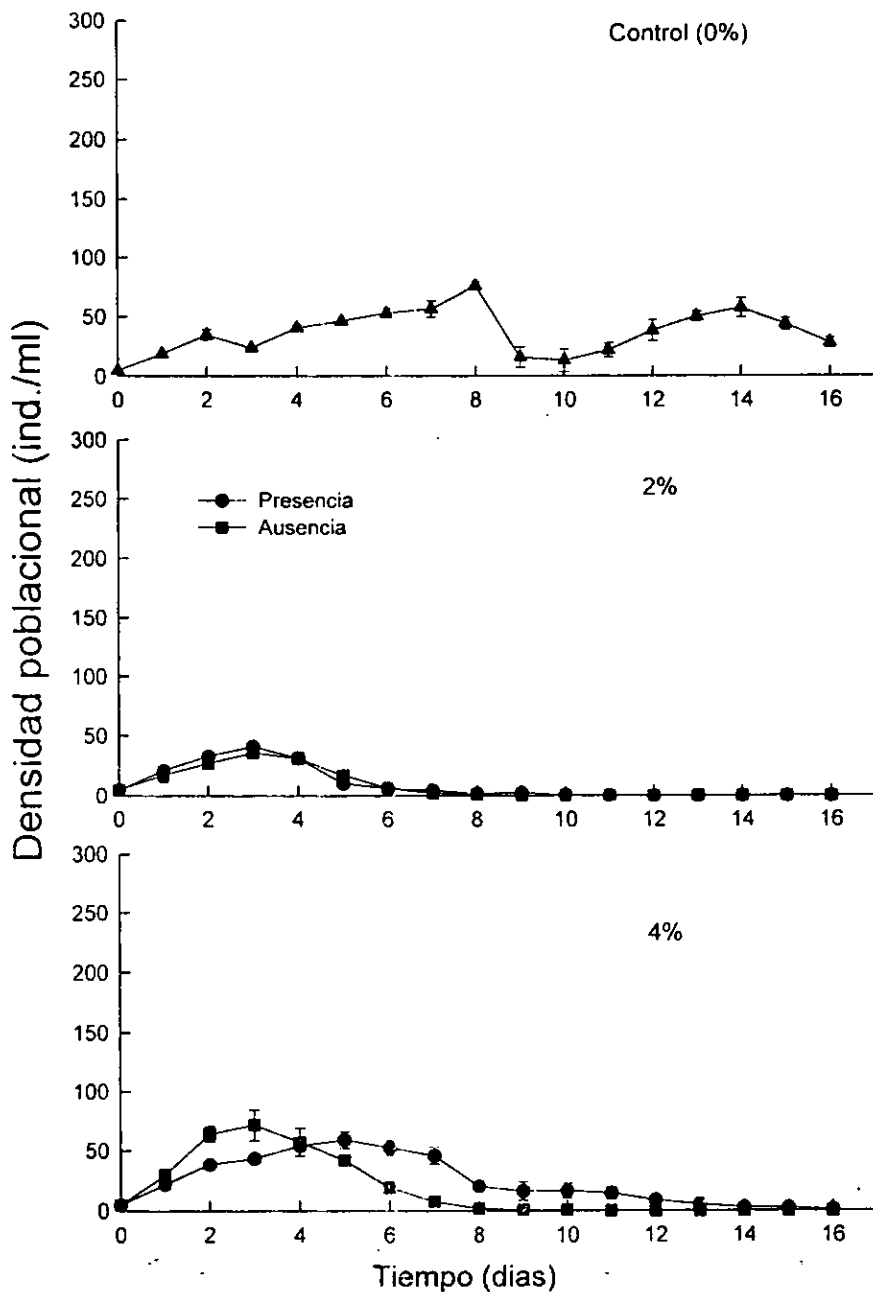


Fig.1. Crecimiento poblacional del rotífero *B. calyciflorus* en relación a diferentes combinaciones de nejayote y en la presencia y ausencia del alga *Chlorella vulgaris* (2×10^6 células ml^{-1}). El experimento fue mantenido a 25 °C. Se muestra el promedio \pm EE, los valores se basaron en 3 réplicas. El control se describe como un cuadrado cerrado.

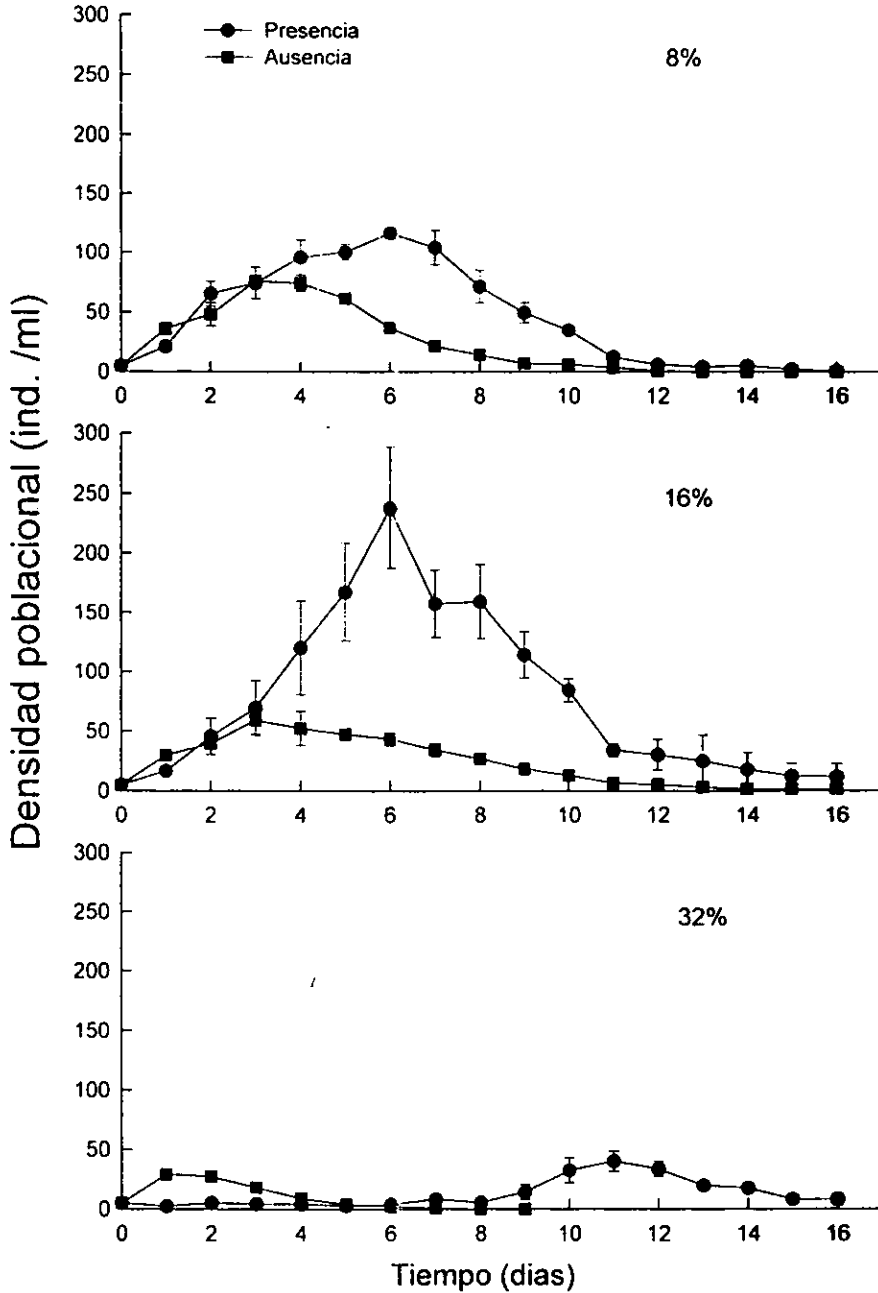


Fig.2. El crecimiento poblacional del rotífero *B. calyciflorus* en relación a diferentes concentraciones de nejayote y en la presencia y la ausencia del alga *Chiorella vulgaris* ($a \times 10^6$ células ml^{-1}). Otros detalles como en la Fig. 1.

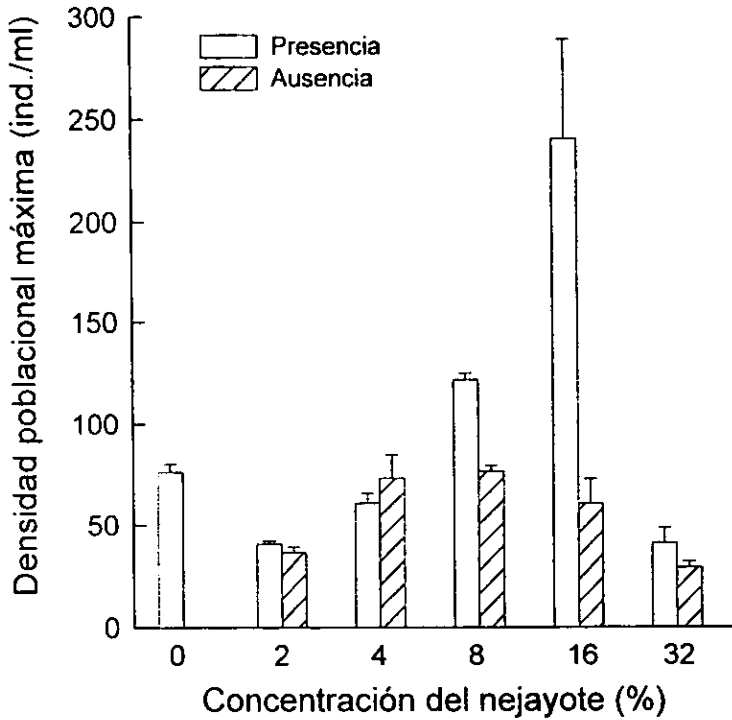


Fig.3. Densidad poblacional máxima alcanzada por *Brachionus calyciflorus* en la presencia (barras blancas) y ausencia (barras negras) del alga *Chlorella* (a 2×10^6 células ml^{-1}) a diferentes concentraciones de nejayote. Se muestra el promedio \pm EE valores registrados en tres réplicas.

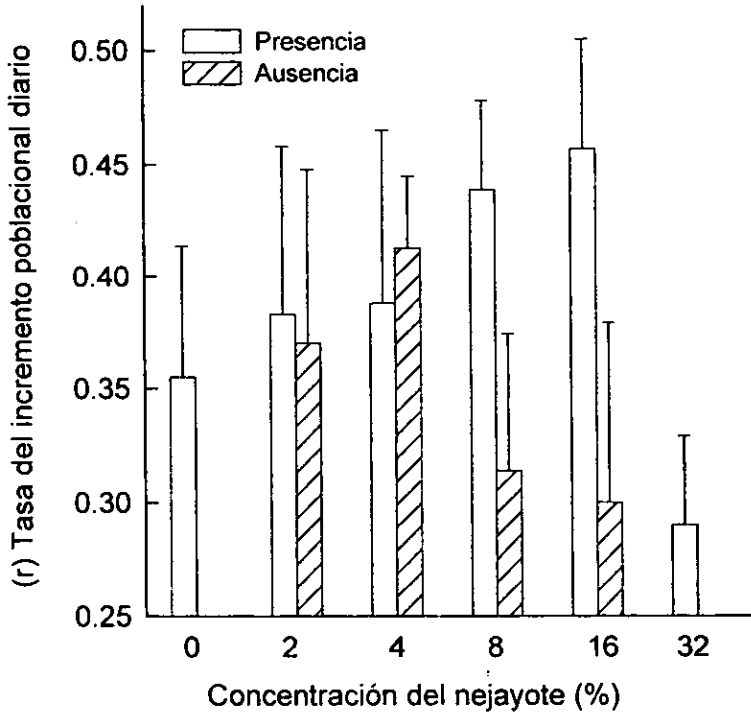


Fig.4. Tiempo de crecimiento poblacional r alcanzado por *Brachionus calyciflorus* en la presencia (barras blancas) y la ausencia (barras negras) del alga *Chlorella* (2×10^6 células ml^{-1}) a diferentes concentraciones de nejayote. Se muestra el promedio \pm EE errores basados en tres réplicas registradas.

CAPITULO II

Influencia de la concentración de alimento (*Chlorella vulgaris*) y temperatura en la dinámica poblacional de *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera)

2.1. INTRODUCCIÓN

El rotífero *Brachionus calyciflorus* ha sido utilizado ampliamente como indicador de contaminación (Joaquim-Justo *et al.*, 1995), como un organismo de bioensayo (Snell y Janssen, 1995), bioensayo estándar por la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales de los Estados Unidos (siglas en inglés ASTM, 1991) y como alimento para criar larvas de peces (Awaiss *et al.*, 1992). *B. calyciflorus* es un rotífero que se ha establecido y está distribuido en muchos cuerpos de agua alrededor del mundo, incluyendo México (Koste, 1978).

Debido a que la talla y la tasa de crecimiento poblacional está normalmente controlada por las condiciones tróficas y la temperatura del ambiente acuático (Halbach, 1970; Bennett y Borass, 1989), los registros sobre la tasa de crecimiento para la misma especie son variables de acuerdo con las localidades y experimentos (Bennett *et al.*, 1993; Rothhaupt, 1993).

Cada una de las cepas de *B. calyciflorus* muestran respuestas diferentes al tipo de alimento y temperatura, (Gilbert, 1970; Starkweather y Keller, 1983; Weithoff y Walz, 1995; Sarma *et al.*, 1997). Si se expresaran los tipos de alimento utilizados en términos del número de células, peso seco, contenido de carbón o valor calórico, los resultados varían ampliamente, ya que la capacidad de un rotífero para digerir un tipo particular de alga, depende de la estructura física y la constitución química de la misma (Pourriot, 1965). La tasa de crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus* bajo condiciones óptimas varía desde 0.1 hasta 2.0 por día (Sarma, 1991). En este trabajo se utiliza el conteo de la densidad de individuos por mililitro para los rotíferos. Por esta razón, no se sabe en que forma una especie de rotífero ó cepa incrementa su densidad poblacional con

el aumento del contenido alimenticio bajo variaciones de temperatura. Esta información es indispensable para poder mejorar el mantenimiento del cultivo de rotíferos que pueden ser efectivamente usados en la acuicultura para la cría de larvas de peces.

2.2. HIPÓTESIS

Si se sabe cuál es la temperatura y la concentración óptima de alimento para el buen crecimiento poblacional de los rotíferos, entonces éstas condiciones se tomaran como un estandar para realizar otros trabajos posteriormente.

2.3. OBJETIVO

Determinar las condiciones para el desarrollo poblacional "óptimo" del rotífero *Brachionus calyciflorus* sujeto a 2 temperatura diferentes y alimentado con alga *Chlorella vulgaris* usando 3 concentraciones

2.4. MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizó *B. calyciflorus* con tamaño promedio de $185 \pm 12 \mu\text{m}$, excluyendo las espinas. Esta especie fue aislada del Lago de Chapultepec (México) y subsecuentemente cultivado en laboratorio usando como alimento exclusivo *Chlorella vulgaris*, cuyo diámetro celular es de $5.48 \pm 1.21 \mu\text{m}$ (Sarma *et al.*, 1997).

Información adicional sobre el cultivo y mantenimiento del alga *Chlorella vulgaris* ver el Apéndice 2.

Los rotíferos se alimentaron diariamente con alga en una densidad de 1×10^6 , 2×10^6 y 4×10^6 células ml^{-1} ; diariamente se colocaron en medio EPA (Anónimo, 1985) utilizando agua desionizada para el cultivo. En los cultivos se mantuvieron altas densidades de rotíferos, aproximadamente 100 individuos ml^{-1} . Sin embargo, se mantuvo la población por debajo de 50 individuos ml^{-1} para reducir la posibilidad de producción de machos y así mantener la población sana y en buenas condiciones. Las densidades poblacionales altas inducen cambios en las condiciones del medio y las hembras en estrés,

producen huevos micticos, de huevos de resistencia y de machos, cambiando las características de la población. Las hembras que están en el medio provienen de huevos amicticos y son hembras partenogénéticas, que no necesitan de machos para fecundar los huevos.

Para los experimentos realizados se trabajó con 2 temperaturas (25°C y 30°C) controlándolas con un termostato sumergible, dentro de un acuario de 5 litros. Por cada combinación y concentración de alimento-temperatura se usaron 3 réplicas con un total de 18 recipientes plásticos transparentes de 25 ml. de capacidad, conteniendo un volumen de 20 ml de medio EPA y pH inicial del medio ajustado a 7.5.

Se introdujeron *B. calyciflorus* de una cepa clonada en una densidad de un individuo ml^{-1} .

El conteo de rotíferos y la estimación de la densidad poblacional se realizó de la misma forma indicada en el capítulo 1.

2.5. RESULTADOS

El crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* estuvo significativamente más influenciado (Tabla 3), por la concentración de alimento y la temperatura. A una concentración de 2×10^6 y temperatura de 25°C se obtiene una densidad de 120 individuos ml^{-1} , ésta densidad no se obtiene en las otras 5 concentraciones, ni a 30°C, (Fig. 5 y 6). Los picos de máxima abundancia de la población en este estudio fluctúa entre 97 ± 4 a 118 ± 6 a 25°C y 36 ± 2 a 83 ± 11 a 30°C respectivamente (Tabla 2). El crecimiento poblacional presenta un desarrollo muy común para el desarrollo de los rotíferos en el campo ó en el laboratorio, alcanzando la etapa asintótica alrededor del día 6 a 30°C, pero el crecimiento asintótico se retrasa en los días 9 y 13 a 25°C, (Fig 5 b y c respectivamente).

La tasa de crecimiento poblacional por día (r) aumenta proporcionalmente con la temperatura y la concentración del alimento ($P < 0.01$, 2 - vías ANOVA). Sin embargo, esta interacción no es estadísticamente significativa ($P > 0.05$, 2 - vías ANOVA ; Tabla

3). El valor de r registrado en este estudio fue de 0.30 ± 0.03 y la concentración de alimento de 1×10^6 células ml^{-1} a 25°C y el promedio más alto de la tasa intrínseca de crecimiento poblacional r fue (0.47 ± 0.01) a una concentración de alimento de 4×10^6 células ml^{-1} a 25°C (Fig. 7).

En todas las pruebas de concentración de alimento, la densidad poblacional máxima y el promedio de las densidades máximas fueron las que alcanzaron los valores en promedio de 98 ± 14 , 118 ± 6 y 97 ± 4 a 25°C . La temperatura, concentración de alimento y su interacción tuvo un impacto significativamente positivo en la densidad poblacional máxima alcanzada y el tiempo tomado para alcanzar el pico promedio de abundancia ($P < 0.01$, 2 - vías ANOVA, Tabla 3).

En las curvas de crecimiento, se observa que los rotíferos, alcanzan una densidad máxima, aunque de menor valor, en menor tiempo a temperatura de 30°C , comparada con la temperatura de 25°C , sin embargo, la duración de la población en la temperatura más alta, es corta, mientras que a los 25°C la población se mantiene por un periodo de tiempo más prolongado.

En el presente estudio, el valor registrado más bajo fue $r = 0.47 \pm 0.01$ y el más alto fue $r = 0.82 \pm 0.03$.

En la tabla 2 se muestran los valores de la densidad poblacional máxima y la densidad máxima promedio y el tiempo en que se alcanza ésta.

2.6. DISCUSIÓN

La cepa de *B. calyciflorus* fue aislada de un lago localizado en una altitud elevada donde las variaciones de temperatura son cercanas a las condiciones subtropicales encontrando que la temperatura del agua raramente excede los 30°C (ver datos de Alcocer y Escobar, 1996). Los valores de temperatura utilizados en el experimento, (25°C , y 30°C) se incluyen el rango promedio anual de temperatura del sitio en que se colectaron los organismos. También es evidente que el valor de r va aumentando proporcionalmente con la densidad de alimento a cualquier temperatura.

Comparado con los trabajos realizados por Sarma *et al.* (1996) se registró el crecimiento de *B. calyciflorus* de una cepa africana, alimentada con *Scenedesmus* en concentraciones de 0.5×10^6 células ml^{-1} a 40.5×10^6 células ml^{-1} ; y se estableció que la tasa de crecimiento poblacional diario varía de 0.792 ± 0.063 a 1.492 ± 0.129 . Sarma *et al.* (1997) registraron el crecimiento de *B. calyciflorus* (también obtenido del lago de Chapultepec) alimentado con *C. vulgaris*, en concentraciones de 0.5×10^6 células ml^{-1} a 4×10^6 células ml^{-1} , pero a una temperatura de (27°C). El factor que se da en los bajos valores de r (0.82 ± 0.03) de este trabajo y haciendo una comparación con aquellos reportados por Sarma *et al.*, (1996) ya que las concentraciones de alimento eran iguales, fue debido tal vez, a las diferencias en la densidad de la inoculación inicial de los rotíferos en los recipientes de prueba en que se llevaron a cabo estos experimentos.

Los parámetros obtenidos durante el cultivo de rotíferos fueron: (a) la densidad máxima poblacional; (b) densidad máxima promedio, la cual es la más usada por la mayoría de los investigadores, (c) el tiempo en que se alcanza la máxima densidad poblacional.

Los valores de las densidades máximas registradas fueron comparados con aquellos establecidos en otros estudios con esta especie. Sarma *et al.*, (1996) reporta que *B. calyciflorus* alcanzó su máxima densidad que fue de 860 ± 69 individuos ml^{-1} a una concentración de 40.5×10^6 células ml^{-1} . En comparación con las concentraciones de alimento de 1, 2 y 4×10^6 células ml^{-1} , y basándose en la ecuación de regresión los valores de la densidad poblacional son bajos (datos obtenidos en 1996, 4, 9 y 48 individuos ml^{-1} , respectivamente, con los mismos valores de alimento) comparados con el presente trabajo (Figs 5 y 6).

En el presente estudio se obtuvo el valor de 118 ± 6 individuos ml^{-1} a 25°C con una densidad de alimento de 2×10^6 células ml^{-1} . Comparando con Sarma *et al.*, (1997) donde se registro una densidad máxima de 137 ± 15 individuos ml^{-1} a 27°C bajo la densidad de alimento de 4×10^6 y la misma especie de alga. El crecimiento de la densidad poblacional de los rotíferos muestra las diferencias que se dan, cuando se usan las

mismas densidades de alimento y reflejan como influye un aumento de la temperatura en el medio.

2.7. CONCLUSIONES

Cuando la temperatura controlada en los recipientes del laboratorio aumenta a 30°C o más, se reduce la densidad poblacional máxima de los rotíferos; esto tal vez se explica con base en a) adaptación, en el presente trabajo, se da una adaptación a la temperatura templada 25°C, ya que las altas temperaturas afectan el crecimiento óptimo de la población; y b) con base en las demandas metabólicas lo cual se incrementa con las altas temperaturas (Sarma y Rao, 1990). Por lo tanto el presente estudio indica que la cepa de *B. calyciflorus* tiene una mejor adaptación natural a 25°C que a 30°C con la misma concentración de alimento 1×10^6 , 2×10^6 y 4×10^6 células ml^{-1} .

2.8. REFERENCIAS

Alcocer, J. and E. Escobar (1996). "Limnological regionalization of Mexico". Lakes & Reservoir: Research and Management. Vol. 2, pp. 55-69.

Anónimo, (1985). "Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms". US Environment Protection Agency. EPA/600/4-85/013.

ASTM, (1991). "Standard guide for acute toxicity tests with the rotifer *Brachionus*". Annual Book of ASTM Standards. Vol. 11.04, E1440, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA.

Awaiss, A., Kestemont, P. and Micha, J.C. (1992). "Nutritional suitability of the rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas for rearing freshwater fish larvae". Journal of Applied Ichthyology. Vol. 8, pp. 263-270.

Bennett, W.N. and Borass, M.E. (1989). "A demographic profile of the fastest growing metazoan: a strain of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera)". Oikos Vol. 55, pp. 365-369.

Bennett, W.N., Borass, M.E. and Seale, D.B. (1993). "Turbidostat culture of *Brachionus calyciflorus*: an experimental system to assess biological limits on population growth". In Walz, N (ed). Plankton regulation dynamics. Experiments and models in rotifer continuous cultures. Springer Verlag, Berlin. Ecological Studies. Vol. 98, pp. 77-86.

Dumont, H. J. and Sarma, S.S.S. (1995). "Demography and population growth of *Asplanchna girodi* (Rotifera) as a function of prey (*Amraeopsis fissa*) density". Hydrobiologia. Vol. 306, pp. 97-107.

Dumont, H. J., Sarma, S. S. S. and Ali, A. J. (1995). "Laboratory studies on the population dynamics of *Amraeopsis fissa* (Rotifera) in relation to food density". Freshwater Biol. Vol. 33, pp. 39-46.

Gilbert, J.J. (1970). "Monoxenic cultivation of the rotifer *Brachionus calyciflorus* in a defined medium". Oecologia. Vol. 4, pp. 89-101.

Halbach, U. (1970). "Einfluss der Temperatur auf die populationsdynamik des planktischen Rädertiere *Brachionus calyciflorus* Pallas". Oecologia. Vol. 4, pp. 176-207.

Iyer, N. and Rao, T. R. (1996). "Responses of predatory rotifer *Asplanchna intermedia* to prey species differing in vulnerability: laboratory and field studies". Freshwater Biology. Vol. 36, pp. 521-534.

Joaquim-Justo, C., Gosselain, V., Descy, J. P. and Thome, J.P. (1995). "Relative importance of the trophic and direct pathways on PCB contamination in the rotifer species *Brachionus calyciflorus* (Pallas)". Hydrobiologia Vol. 313/314: 249-257.

Koste, W. (1978). "Rotatoria. Die Radertiere Mitteleuropas". Gebruder, Borntraeger, Berlin, Vol. 1 & Vol. 2.

Pourriot, R. (1965). "Recherches sur l'écologie des Rotiferes". Vie et Milieu (Suppl.) 21: pp. 1-224.

Rothhaupt, K. O. (1993). "Steady-state growth and carbon metabolism of *Brachionus rubens* and *B. calyciflorus*". In: In Walz, N (ed). Plankton regulation dynamics. Experiments and models in rotifer continuous cultures. Springer Verlag, Berlin. Ecological Studies Vol. 98, pp. 123-132.

Sarma, S. S. S. (1996). "Rotifer mass culture systems". Chapter 3. In: International Workshop on Rotifer Culture Systems. Laboratory Manual. UNAM Campus Iztacala, México, pp. 22-27.

Sarma, S.S.S. (1991). "Global bibliography on Rotifera". Bioinformatics Centre, Madurai Kamaraj University, Madurai, India, Vol. 1, pp. 1-485.

Sarma, S.S.S. and Rao, T. R. (1990). "Population dynamics of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) in relation to food and temperature". Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.). Vol. 99, pp. 335-343.

Sarma, S.S.S., Iyer, N. and Dumont, H.J. (1996). "Competitive interactions between herbivorous rotifers: importance of food concentration and initial population density". Hydrobiologia. Vol. 331, pp. 1-7.

Sarma, S.S.S., Araiza, M. A. F. and López, R. J. A. (1997). "Influence of food concentration and inoculation density on the population growth of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera)". Environment & Ecology. Vol. 15, pp. 435-441.

Snell, T. W. and Janssen, C. R. (1995). "Rotifers in ecotoxicology: a review". Hydrobiologia. Vol. 313/314, pp. 231-247.

Starkweather, P. L. and Keller, P. E. (1983). "Utilization of cyanobacteria by *Brachionus calyciflorus*: *Anabaena flos-aquae* (NRC-44-1) as a sole or complementary food source". Hydrobiologia Vol. 104, pp. 373-377.

Weithoff, G. & Walz, N. (1995). "Influence of the filamentous cyanobacterium *Planktothrix agardhii* on population growth and reproductive pattern of the rotifer *Brachionus calyciflorus*". *Hydrobiologia*. Vol. 313/314, pp. 381-386.

Tabla 2. Información de la máxima densidad poblacional y la densidad poblacional más relevante de *Brachionus calyciflorus* con relación a la densidad de alimento. Los datos se expresan en días en los cuales la densidad máxima poblacional y la densidad pico fueron obtenidos (vea el texto).

Temp. (° C)	Densidad de Alimento (x 10 ⁶ células ml ⁻¹)	Densidad poblacional máxima (No./ml) Y ± d.s.	Día de la densidad poblacional máxima Y±d.s.	Densidad máxima alcanzada (no./ml) Y±d.s.	Día donde se alcanzó la primera densidad máxima
25 °C	1	104±5	12.7±1.2	98±14	12
	2	110±14	12.7±0.6	118±6	13
	4	97±13	9.0±0.0	97±4	9
30 °C	1	38±4	8.0±1.7	36±2	9
	2	45±5	6.0±0.0	45±5	6
	4	85±8	14.7±0.6	83±11	6

Tabla 3. Análisis estadístico de varianza de dos - vías (ANOVA) de las variables poblacionales seleccionadas en *B. calyciflorus*.

VARIABLE	PARÁMETROS	df	SS	MS	tiempo A	P
POBLACIONAL						
Densidad Poblacional Máxima						
	Concentración Alimento (F)	de 2	1279.67	639.84	7.39	0.01
	Temperatura (T)	1	10115.13	10115.13	116.77	0.001
	Interacción (F x T)	2	2822.02	1411.01	16.29	0.001
	Error	12	1039.45	86.62	-	
Día de la Densidad Máxima						
	Concentración Alimento (F)	de 2	19.00	9.50	11.40	0.01
	Temperatura (T)	1	16.06	16.06	19.27	0.01
	Interacción (F x T)	2	131.44	65.72	78.87	0.001
	Error	12	10.00	0.83	-	
Tiempo de Crecimiento Poblacional (r)						
	Concentración Alimento (F)	de 2	0.022	0.011	8.46	0.01
	Temperatura (T)	1	0.027	0.027	20.77	0.001
	Interacción (F x T)	2	0.003	0.0015	1.15	0.350
	Error	12	0.016	0.0013		

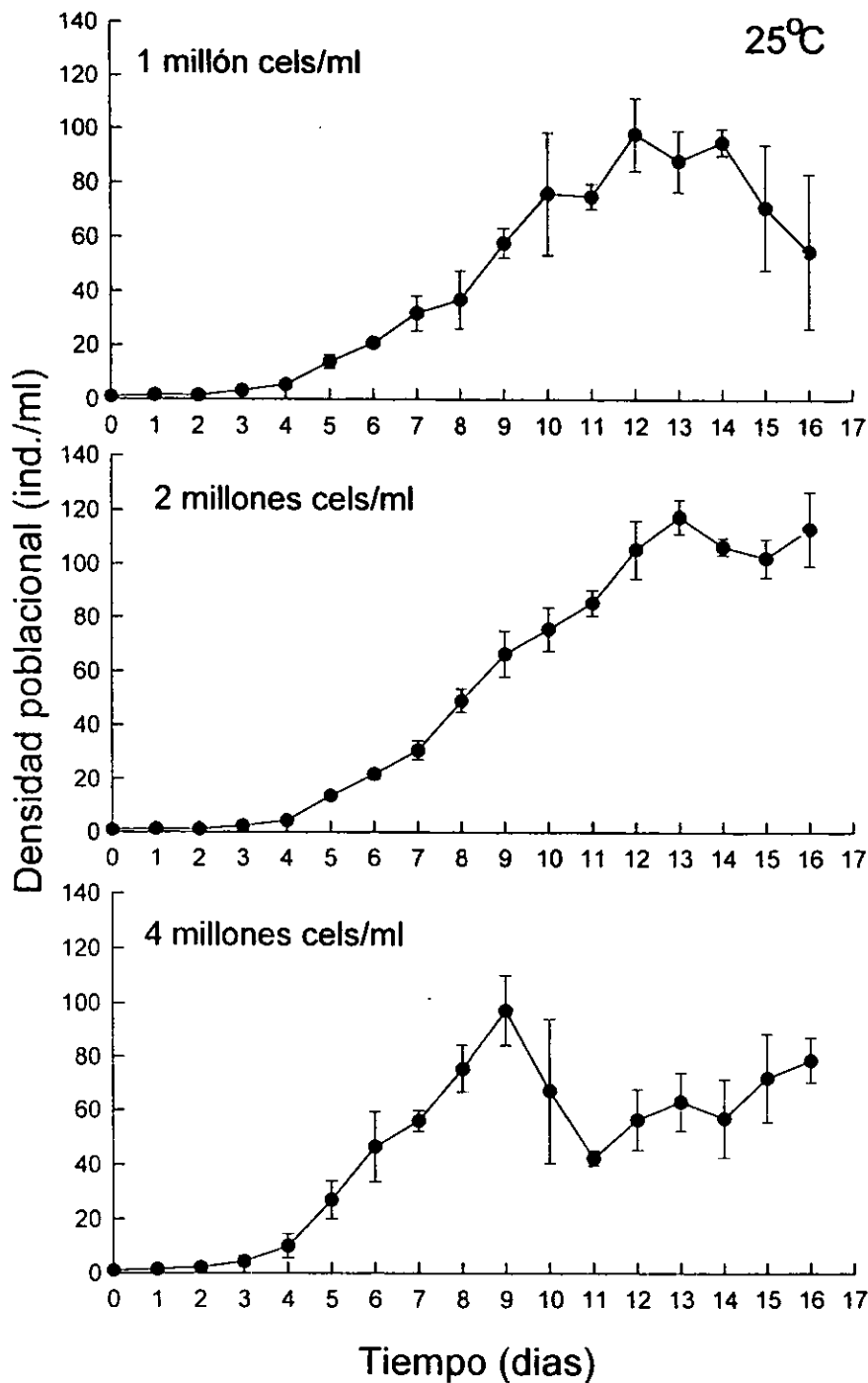


Fig. 5. Crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* a 25°C a tres diferentes concentraciones 1, 2 y 4 x 10⁶ células ml⁻¹ de alimento algal (*Chlorella vulgaris*) en relación al tiempo. Los valores mostrados son promedio ± DS basados en 3 réplicas registradas.

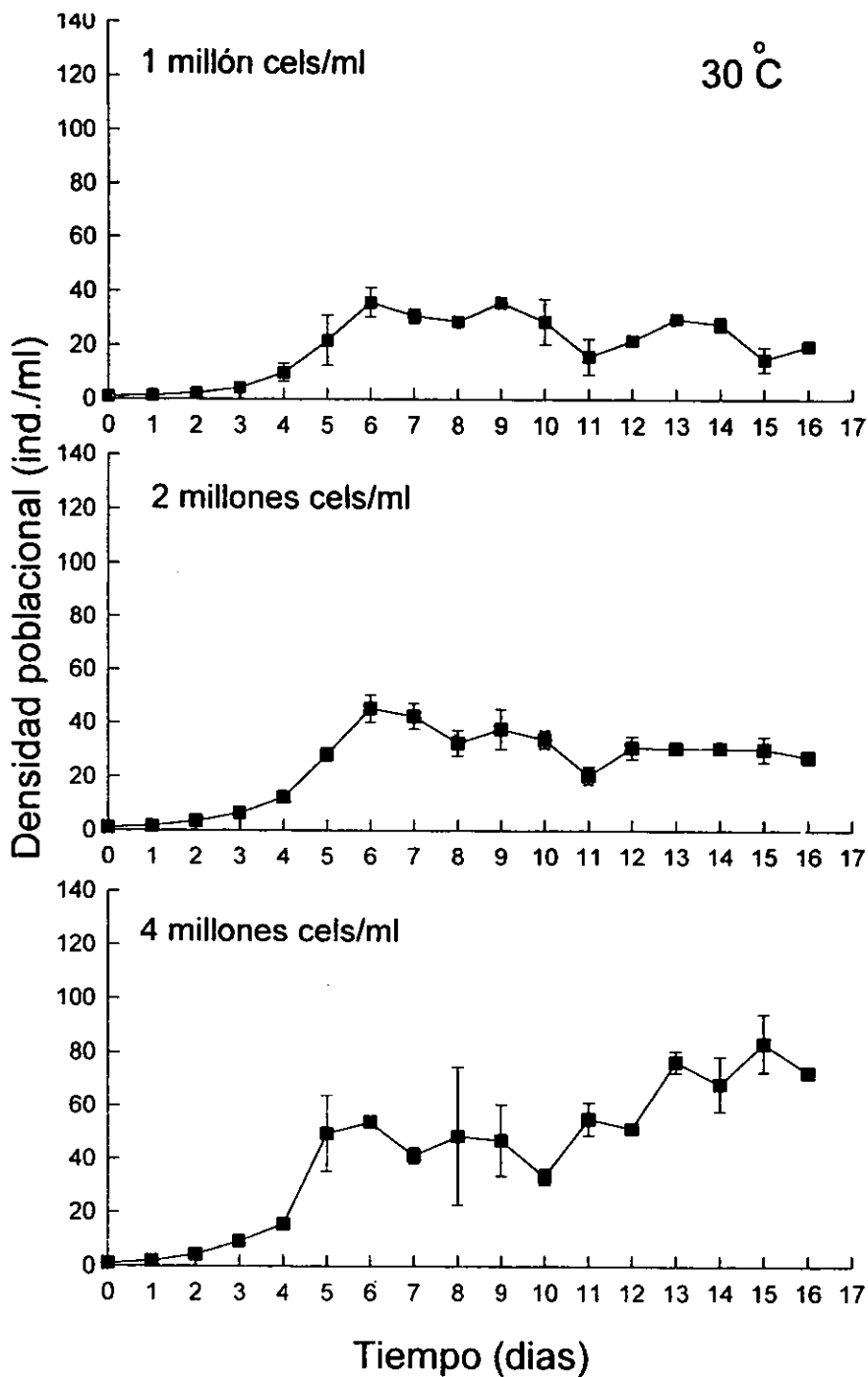


Fig. 6. Crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* a 30°C a tres diferentes concentraciones 1, 2 y 4 x 10⁶ células ml⁻¹ de alimento algal (*Chlorella vulgaris*) en relación al tiempo. Los valores mostrados son promedio ± DS basados en 3 réplicas registradas.

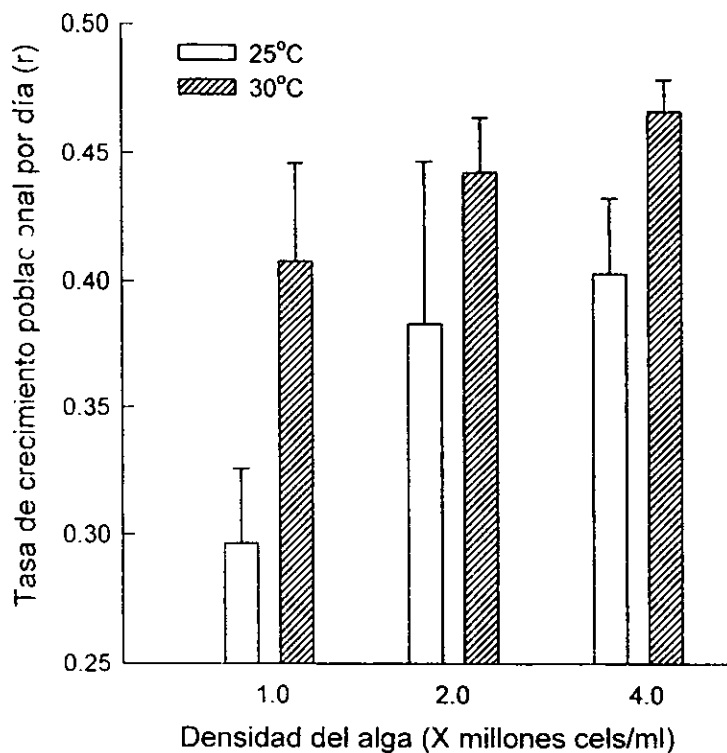


Fig 7. El tiempo de incremento poblacional por día (r) de *B. calyciflorus* sujeto a tres concentraciones de alimento (*Chlorella vulgaris*) de alga ($1, 2$ y 4×10^6 células ml^{-1}) a 25°C (blanco vacío) y 30°C (blanco cortado). Los valores mostrados son promedio \pm DS basados en tres replicados.

CAPITULO III

Calidad nutricional de la presa *Brachionus calyciflorus* y su efecto en el crecimiento poblacional del rotífero depredador *Asplanchna sieboldi* (Rotifera)

3.1. INTRODUCCIÓN

Todos los miembros del género *Asplanchna* son depredadores; su dieta no esta predominantemente basada en ciliados (Arnd, 1993) y rotíferos (Kabarín, 1974), sino también consiste de cladóceros (Guiste, 1977) y copépodos (Williamson, 1983). Numerosos estudios de campo y de laboratorio tienen registrados el número de presas y sus densidades, encontradas en el intestino de *Asplanchna* (Green y Lan, 1974; Sarma, 1993; Iyer y Rao, 1996). Esto implica que la presión de la depredación por *Asplanchna* en la comunidad de zooplancton de talla pequeña es considerable.

Los rotíferos, particularmente del género *Brachionus*, son ampliamente usados en la acuicultura. En México sus técnicas de cultivo comienzan a ser implementadas recientemente (Ramírez-Sevilla *et al.*, 1991; Castellanos-Páez *et al.*, 1994a,b; Anónimo, 1996,1997). En las prácticas de acuicultura, no sólo el tipo y tamaño de la presa son importantes para el depredador; también lo es su calidad nutricional. Amplias investigaciones indican que el valor nutricional de *Brachionus* depende en alto grado de la naturaleza de la dieta proporcionada (Hamza y Robin, 1992). El cultivo de rotíferos con levadura, por ejemplo; tiene deficiencias en ácidos grasos, a diferencia de los que se cultivan con algas verdes tales como *Chlorella* (Rodríguez *et al.*, 1996). Esto es esencial en las pruebas de calidad nutricional. El crecimiento de la presa que se alimenta de un medio en particular para ser consumida por el depredador, y ver que efecto tiene en términos de crecimiento poblacional, es una prueba que se recomendaba realizar para usar esta presa en la acuicultura.

En el capítulo I se muestra que *Brachionus calyciflorus* puede fácilmente ser cultivado en nejayote. La alta producción de *B. calyciflorus* en estos afluentes puede ser aprovechado en la producción de peces, si la calidad nutricional de los rotíferos que se

alimentan en éste medio es buena. En pruebas realizadas con estos rotíferos, usando al rotífero depredador *Asplanchna sieboldi* como una herramienta de bioensayo se comparan los rangos del crecimiento obtenidos cuando se alimenta de *B. calyciflorus* cultivados bajo tres condiciones: alimentados solo con *C. vulgaris*, así como una mezcla de *C. vulgaris* + nejayote, y el nejayote solamente.

3.2. HIPÓTESIS

Si *Brachionus calyciflorus* alimentado de nejayote contiene los nutrientes requeridos por el rotífero depredador *Asplanchna sieboldi*, entonces la calidad nutricional del primero, se refleja en el crecimiento poblacional del segundo.

3.3. OBJETIVO

Evaluar la calidad nutricional del rotífero *Brachionus calyciflorus* usado como presa, alimentado con nejayote, nejayote + alga y solo alga, observando como afecta la dinámica poblacional del rotífero depredador *Asplanchna sieboldi* comparado con los rotíferos que se alimentan con alga.

3.4. MATERIAL y MÉTODO

Se usaron dos especies de rotíferos para este trabajo: *B. calyciflorus* Pallas, 1766 como la presa y *A. sieboldi* (Leydig, 1854) como el depredador. Ambas especies de rotíferos fueron aisladas de estanques y se clonaron por los últimos 6 meses previos al experimento, para adaptarse al medio de cultivo.

B. calyciflorus fue cultivado separadamente en acuarios de vidrio de 50 litros de capacidad usando tres tipos de alimento. Se usaron algas verdes *C. vulgaris* para criar *B. calyciflorus* el cual actúo como la dieta control. En el laboratorio del acuario de la UNAM Campus Iztacala, se criaron *B. calyciflorus* en densidades de 200 ± 20 individuos ml^{-1} usando nejayote+alga y nejayote como dieta experimental. Las condiciones fueron favorables ya que el incremento máximo de población de *B. calyciflorus* fue en nejayote diluído al 16% con medio EPA (EPA, 1985) después de ser

filtrado a través de una malla de 20 μ m (para remover las partículas orgánicas grandes y los ciliados) y el pH y la temperatura se ajustaron a 7.0 y a 25°C, respectivamente (ver capítulo 1). Se manejaron 3 combinaciones de presa, los *B. calyciflorus* que crecieron en nejayote, en 50% de *C. vulgaris* (a una densidad de 2 x 10⁶ células ml⁻¹) y 50% de nejayote (a una dilución del 16%) y el control que se alimentó solo de alga *C. vulgaris*.

El depredador *A. sieboldi* se cultivó en un acuario de vidrio de 1 litro de capacidad en medio EPA y se alimentó de *B. calyciflorus* que se alimentaba a su vez con *C. vulgaris* como alimento exclusivo. Aunque *A. sieboldi* pudo crecer a densidades tan altas como (10 individuos ml⁻¹), la población se mantuvo a una densidad promedio menor de 2 individuos ml⁻¹ para evitar que las hembras sufrieran estrés.

Para el experimento se usaron recipientes de plástico transparentes de 25 ml, conteniendo 20 ml de medio EPA con la presa que creció en cada una de las tres combinaciones de alimento. A estos recipientes de prueba se le adicionó alga diluida (0.5 x 10⁶ células ml⁻¹) en pequeñas cantidades (3 ml) y nejayote (a una concentración del 10%). Se usaron cuatro concentraciones de presas (2.5, 5, 10 y 20 individuos ml⁻¹), se manejaron tres réplicas para cada tipo de presa y concentración. En total se usaron 36 recipientes de prueba (3 tipos de presa nutricional x 4 densidades de presa x 3 réplicas = 36). Dentro de cada uno de los recipientes de prueba que contenían presas en un estado de nutrición en particular y de densidad, se introdujeron juveniles de *A. sieboldi* en una densidad inicial de 0.1 individuo ml⁻¹. La densidad de las presas y los depredadores fue contada individualmente con un microscopio estereoscópico, contenidos en una cajita de acrílico para poder contar a los organismos y sacarlos con una pipeta Pasteur.

Siguiendo la inoculación inicial, se monitoreó la densidad poblacional del depredador cada 24 horas, los depredadores sobrevivientes fueron transferidos a un recipiente nuevo con el tipo de alimento seleccionado y a la densidad deseada. Los machos y los organismos muertos fueron raros y se encontraban a bajas densidades cuando se tenía una población máxima; estos fueron removidos cuando se encontraban y no se incluyeron para estimar la densidad poblacional de *A. sieboldi*. El experimento se terminó el día 10 cuando la población completó su ciclo ó mostró una disminución en el

crecimiento poblacional. Se calculó la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) (Capítulo 2).

Para ver la diferencia en la calidad nutricional del tipo de alimento y su influencia en el tamaño del cuerpo de *B. calyciflorus*, se midieron sólo las hembras que portaron huevos en la fase exponencial de su crecimiento. Para medir el tamaño del cuerpo, se separaron 50 hembras ovígeras para cada uno de los tanques de cultivo y se fijaron en formol al 5%. Las medidas de *B. calyciflorus* incluyeron el largo y el ancho; las espinas anteriores, posteriores y posterolaterales no se incluyeron. Se usó un micrómetro ocular, calibrándolo para medir el tamaño de los rotíferos, los cuales fueron medidos usando dicho micrómetro. El tamaño del cuerpo del rotífero fue expresado en volumen (μm^3) siguiendo a Ruttner-Kolisko (1977) y Walz *et al.* (1995).

3.5. RESULTADOS

La curva obtenida del crecimiento poblacional de *A. sieboldi* alimentado de diferentes tipos de presas y densidades, muestra oscilaciones en los depredadores (Figuras 8 a 13). En general, muchas poblaciones muestran una fase de adaptación muy corta, una fase exponencial y una fase estacionaria. La densidad promedio de *A. sieboldi* varía desde 0.24 ± 0.01 individuos ml^{-1} a 2.24 ± 0.17 individuos ml^{-1} en las densidades bajas de las presas (2.5 individuos ml^{-1}) que crecen en la mezcla de nejayote o de aquellos de densidades altas (20 individuos ml^{-1}) criados en nejayote.

Los efectos nutricionales de las presas que crecen en diferentes tipos de alimento fueron evidentes en términos de las densidades máximas registradas por *A. sieboldi*. En general, se obtuvo una abundancia significativamente mayor de los asplácidos que se alimentan de presas que crecen en el nejayote al compararse con las otras que se alimentaron en ambos casos solo de alga ó de alga más nejayote ($P < 0.05$, ANOVA, Tabla 4, Sokal y Rohlf, 1981). La proporción del crecimiento poblacional calculado durante la fase exponencial de población muestra tendencias similares (Fig. 12, Tabla 4).

La proporción más alta del crecimiento registrado en *A. sieboldi* que se alimentó de *B. calyciflorus* y que creció en nejayote y nejayote más alga fue de 0.95 ± 0.01 y la más baja fue de 0.33 ± 0.04 respectivamente.

El tamaño del cuerpo de *B. calyciflorus* que creció en diferentes tipos de alimento muestra diferencias significativas ($P < 0.05$, A-prueba, Tabla 4, Fig. 13). Los adultos con tamaño pequeño ($6.24 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) fueron observados en las poblaciones que nacieron en el nejayote, mientras que los individuos grandes ($7.98 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) se obtuvieron de los que se alimentaron del alga. El tamaño del cuerpo de los braquióridos criados en la mezcla del nejayote más alga mostraron resultados intermedios.

Los valores de "r" para *B. calyciflorus* fueron afectados significativamente por la adición de alga al medio y la concentración del nejayote, teniendo un impacto significativo ($P < 0.001$, 2 - vías ANOVA, Tabla 1) en el tiempo del crecimiento poblacional. Las concentraciones del 2% y 4% de nejayote y nejayote + *C. vulgaris* no tuvieron un valor significativo para el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* como presa ($P < 0.05$ F- prueba). En las concentraciones del 16% y 32% de nejayote + *C. vulgaris* las máximas densidades observadas fueron (61 ± 12 y 29 ± 3 individuos ml^{-1}) que son bajas haciendo una comparación con la densidad obtenida de los rotíferos alimentados con nejayote en las mismas concentraciones.

3.6. DISCUSIÓN

La adición del alga a altas concentraciones de nejayote, puede ayudar en la absorción ó utilización uniforme de las sustancias tóxicas disueltas, tales como amonio y otros compuestos inorgánicos como nitrógeno (Borowitzka & Borowitzka, 1988). En general, muchas poblaciones muestran una fase de adaptación muy corta, una fase exponencial y una fase estacionaria.

La curva de crecimiento poblacional de *A. sieboldi* obtenida aquí es muy común para el zooplankton oportunista (Downing y Rigler, 1984; Rothhaupt, 1988; Rothhaupt y Lampert, 1992; Rico-Martínez y Dolson, 1992). Las variaciones en la abundancia poblacional de las especies de *Asplanchna* en relación al tipo de presas indican que la calidad nutricional juega un papel importante. Por ejemplo, Maly (1975) muestra que *A. brightwelli* alimentado con *Euglena* tuvo un crecimiento y una sobrevivencia pobre cuando se comparó con los que se alimentaban de *Paramecium* en biomásas que eran

comparables. Stemberger y Gilbert (1984) tienen documentado que la entrada de concentraciones de alimento requerido para mantener una población de *Asplanchna* varía de 0.5-0.7 μg por μg del peso seco del depredador por día. Sin embargo, los datos en la calidad nutricional de algunas presas que crecen en diferentes condiciones de cultivo no son las adecuadas. Rothhaupt (1995) muestra que *Barchionus rubens* que se alimentaron con una dieta de *Scenedesmus* que se cultivó con un medio de nutrientes limitados (cantidad de fósforo en el medio disminuido) y otro medio con nutrientes no limitados en proporciones comparables, las más altas densidades de crecimiento fueron obtenidas cuando *Barchionus rubens* se alimento de *Scenedesmus* que creció en el medio con los nutrientes no limitados. Esto implica que la calidad nutricional del alimento determina el control en la abundancia de estos consumidores secundarios.

Se tiene bien establecido que la calidad nutricional de los braquióñidos usados como presa es altamente determinante por el tipo de alimento con el cuál se alimentan (Watanabe *et al.* 1993).

3.7. CONCLUSION

La composición química de muchas especies de cultivos de alga incluyendo *Chlorella vulgaris* está bien documentada bajo una variedad de condiciones de medio de cultivo (Kuhl y Lorenzen, 1964). Sin embargo, la composición química del nejayote no ha sido completamente estudiada (Pedroza, 1985). No se realizó un estudio bromatológico de la composición química de *B. calyciflorus* que se alimento de las dietas diferentes que se proporcionaron en este trabajo, por no tener acceso. Sin embargo, el primer paso hacia tal estudio podría ser entendido por los efectos que tiene *B. calyciflorus* en la densidad poblacional de los consumidores terciarios. Tradicionalmente las larvas de peces son usadas para saber cual es el estado de la calidad nutricional de los rotíferos (Fukusho, 1989). Por lo tanto *Asplanchna*, puede ser usado como una herramienta de bioensayo para hacer pruebas de esta naturaleza. Estos ensayos permitirán saber cuál es la respuesta numérica que está en relación al tamaño, densidad, movimiento y acumulación de toxinas en la presa (Snell y Janssen, 1995; Iyer y Rao,

1996). Este estudio muestra que la calidad nutricional de los rotíferos usados como presas afecta la respuesta numérica de *Asplanchna*.

La proporción del tamaño del cuerpo observado en *B. calyciflorus* fue pequeño ($6.24 \times 10^5 - 7.98 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) en comparación a lo reportado por Walz *et al.* (1995) ($18.15 \times 10^5 - 23.94 \times 10^5 \mu\text{m}^3$). Sin embargo, las diferencias en las tallas del tamaño del cuerpo de esta especie son normales en la altura y las medidas para esta especie se encuentra dentro de estos rangos ($4.78 \times 10^5 - 150.62 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ Kutikova y Fernando, 1995). Cuando *B. calyciflorus* se alimentó de *C. vulgaris*, el tamaño del cuerpo de los adultos fue significativamente grande en comparación a los que se alimentaron del nejayote ($P < 0.01$, A-prueba, Tabla 4). Aún, la densidad poblacional promedio o el promedio de crecimiento de *A. sieboldi* son bajos cuando se alimenta de *B. calyciflorus* el cuál consume *C. vulgaris*. Esto podría ser debido a que la calidad nutricional de estos rotíferos es menor, en comparación a los que consumen el nejayote. Un bioensayo temprano señala que *B. calyciflorus* muestra un importante promedio de crecimiento cuando se cultivó en nejayote que cuando se cultivo en *C. vulgaris* (Capítulo 1). El promedio de crecimiento de los rotíferos que se alimentan de nejayote anula los factores que afectan directamente ó indirectamente el tamaño del cuerpo obtenido en este estudio; cada uno bajo condiciones de cultivo controladas. Estos incluyen la fase de crecimiento poblacional (Yufera, 1984; Sarma 1996), densidad de alimento (Duncan, 1989) y composición de la carga bacteriana en el nejayote (Pedroza, 1985; Durán de Bazúa, 1988). Las bacterias son el último factor que se debe asumir como suplemento alimenticio para el *Asplanchna* en el recipiente de prueba. Para evaluar esto, se diseñó un experimento separadamente introduciendo *A. sieboldi* individualmente en los recipientes de prueba, conteniendo 20 ml. de medio con alga, alga + nejayote y solo nejayote sin *Brachionus*; los datos que pertenecen a este experimento son presentados en la tabla 5. En estos datos es evidente que no ocurre la reproducción de *A. sieboldi* en la ausencia de los braquiiónidos presa, aunque los individuos continuaron viviendo por unos pocos días más en el medio preparado con nejayote, con ó sin la adición del alga. Esto no podría tener un efecto significativo en el crecimiento de la densidad poblacional de *A. sieboldi* en esta prueba, porque sólamente se usaron pequeños volúmenes de nejayote diluido. El pobre crecimiento de *A. sieboldi* alimentado de *B. calyciflorus* que crecieron en una mezcla de alga y el nejayote puede ser atribuída a la saturación del aparato digestivo del

rotífero *B. calyciflorus* más que a la pérdida de la calidad nutricional de *C. vulgaris*, ya que cuando se satura el aparato digestivo no se aprovechan los nutrientes. Un consistente crecimiento poblacional de *A. sieboldi* alimentado de *B. calyciflorus* criado en nejayote probablemente implica una mejor calidad nutricional de los rotíferos presa utilizados en este experimento y la sustitución de su alimento natural que fue *C. vulgaris*.

3.8. REFERENCIAS

Anónimo, 1996. *Laboratory Manual*. International workshop on rotifer culture systems. Extensión Universitaria, UNAM Campus Iztacala, Edo. México, México: 56 pp.

Anónimo, 1997. *Field and Laboratory Manual*. International workshop on field cultivation technology of rotifers for use as food in aquaculture. Acuario Veracruz & Extensión Universitaria, UNAM Campus Iztacala, Edo. México, México: 36 pp.

Arndt, H., 1993. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) - a review. *Hydrobiologia* 255/256: 231-246.

Borowitzka, M. A. & L. J. Borowitzka. 1988. "Micro-algal biotechnology". Cambridge University Press, London. 477 pp.

Castellanos-Páez, M.E., S. Marañón-Herrera and G. Garza-Mourino, 1994a. Modelo de crecimiento en longitud y anchura del rotífero *Brachionus plicatilis* (Muller 1786), en tres razas asiáticas. *Hidrobiologica* 4: 9-14.

Castellanos-Páez, M.E., S. Marañón-Herrera and G. Garza-Mouriño, 1994b. Diagnóstico morfométrico del rotífero *Brachionus plicatilis* (Muller 1786), con variables indicadoras "dummy". *Hidrobiologica* 4: 29-34.

Downing, J.A. and F. H. Rigler, 1984. *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters*. IBP Hand Book 17, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 501 pp.

Duncan, A., 1989. Food limitation and body size in the life cycles of planktonic rotifers and cladocerans. *Hydrobiologia* 186/187: 11-28.

Durán de Bazúa, C. 1988. *Una nueva tecnología para la extrusión alcalina de maíz y sorgo*. Monografía Tecnológica 2. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico D. F., 71 pp.

Ejamont-Karabin, J. 1974. Studies on the feeding of planktonic polyphage *Asplanchna priodonta* Gosse (Rotatoria). *Ekologyca poska*. 26: 311-317.

Fukusho, K. 1989. Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. 2. *International Journal of Aquatic Fisheries Technology* 1: 292-299.

Green, J. and O. B. Lan, 1974. *Asplanchna* and the species *Brachionus calyciflorus* in two Javanese sewage ponds. *Freshwater Biol.* 4: 223-226.

Guiset, A. 1977. Stomach contents in *Asplanchna* and *Ploesoma*. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 126 - 129.

Hamza, N. and J. Robin, 1992. Effects of CO₂ on the lipid composition of the algae-rotifers trophic chain. *Proc. 15th Journees Int. du GABIM, Intechmer* 18: 2-185-188.

Iyer, N. and T. R. Rao. 1996. Responses of the predatory rotifer *Asplanchna intermedia* to prey species differing in vulnerability: Laboratory and field studies. *Freshwater Biol.* 36: 521-533.

Kuhl, A. and H. Lorenzen, 1964. Handling and culturing of *Chlorella*. In: D. M. Prescott (ed.). *Methods in Cell Physiology*. Vol. 1. Academic Press, New York: 159-187.

Kutikova, L. A. and C. H. Fernando, 1995. *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotatoria) in inland waters of tropical latitudes. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 80: 429-441.

Maly, E., 1975. Interaction among the predatory rotifer *Asplanchna* and two prey, *Paramecium* and *Euglena*. *Ecology* 56: 346-358.

Pedroza, R. 1985. *Estudio de la degradación biológica de los efluentes de la nixtamalización*. Tesis de maestría, Universidad Iberoamericana. México D.F., Mexico.

Ramírez-Sevilla, R., R. Rueda-Jasso, J.L. Ortiz-Galindo and B. González-Acosta, 1991. Metodología para el cultivo experimental del rotífero *Brachionus plicatilis*. *Inv. Mar. CICIMAR* 6: 287-290.

Rico-Martinez, R. and S. I. Dodson, 1992. Culture of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Aquaculture* 105: 191-199.

Rodriguez, C., Perez, J.A., Izquierdo, M. S. Cejas, J.R. Bolanos, A. and Lorenzo, A. 1996. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period. *Aquaculture* 147: 93-105.

Rothhaupt, K.O. 1988. Mechanistic resource competition theory applied to laboratory experiments with zooplankton. *Nature* 333: 660 - 662.

Rothhaupt, K.O. and Lampert, W. 1992. Growth rate dependent feeding rates in *Daphnia pulex* and *Brachionus rubens*: adaptations to intermediate time-scale variations in food abundance. *J. Plankton Res.* 14: 735-751.

Rothhaupt, K.O., 1995. Algal nutrient limitation affects rotifer growth rate but not ingestion rate. *Limnology and Oceanography* 40: 1201-1208

Ruttner-Kolisko, A. 1977. Suggestions for biomass calculation of plankton rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 71 - 76.

Sarma, S.S.S. 1993. Feeding responses of *Asplanchna brightwelli* (Rotifera): laboratory and field studies. *Hydrobiologia* 255/256: 275-282.

Sarma, S.S.S. 1996. Some relationships between size structure and fertility of rotifer populations. In: B. L. Kaul (ed.). *Advances in fish and wildlife ecology and biology*. Daya Publishing House, Tri Nagar, Delhi, India: 37-50.

Snell, T.W. and Janssen, C.R. 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia* 313-314: 231-247 .

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf, 1981. *Biometry*. Second Edition. W. H. Freeman & Company, San Francisco. 859 pp.

Stemberger, R.S. and J.J. Gilbert, 1984. Body size, ration level and population growth in *Asplanchna*. *Oecologia* 64: 355-359.

Walz, N., S.S.S. Sarma & U. Benker. 1995. Egg size in relation to body size in rotifers: An indication of reproductive strategy? *Hydrobiologia* 313/314: 165-170.

Watanabe, T., C. Kitajima and S. Fujita, 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34: 115-143.

Williamson, C.E. 1983. Invertebrate predation of planktonic rotifers. *Hydrobiologia* 104: 385-396.

Yufera, M. 1982. Morphometric characterization of a small-sized strain of *Brachionus plicatilis* in culture. *Aquaculture* 27: 55-61.

Tabla 4. Análisis estadístico de las variables poblacionales seleccionadas observadas en este estudio.

Variable	DF	SS	MS	F	P
<i>Densidad poblacional máxima</i>					
Tipo de alimento	2	2.345	1.17	43.63	0.001
Densidad de alimento	3	13.809	4.6	171.28	0.001
Interacción	6	0.0878	0.15	5.44	0.01
Error	24	0.06455	0.03	-	-
<i>Proporción del incremento poblacional</i>					
Tipo de alimento	2	0.495	0.25	104.89	0.001
Densidad de alimento	3	0.519	0.17	73.31	0.001
Interacción	6	0.014	0.0023	0.96	ns
Error	24	0.057	0.0024	-	-
<i>Volumen del cuerpo</i>					
Tipos de alimento	2	85200 x 10 ⁷	42600 x 10 ⁷	22.87	0.001
Entre ambos	147	273856 x 10 ⁷	1863 x 10 ⁷	-	-

Tabla 5. Datos de densidad poblacional de *A. sieboldi* mantenidos en 20 ml de alga (*Chlorella* a 2×10^6 células/ml), alga + nejayote (diluida en proporción del 16%) y nejayote. Para cada uno de los recipientes de prueba, fueron usados 2 neonatos de *A. sieboldi*. Para cada tipo de alimento, se usaron tres réplicas. La densidad de *A. sieboldi* fue estimada diariamente y el medio se cambió, con medio fresco después de cada conteo. Los valores mostrados son promedio \pm EE para 20 ml de volumen. El experimento se dio por terminado en cada prueba cuando los individuos murieron.

Día	Alga	Alga+ nejayote	Nejayote
0	2.00 \pm 0.00	2.00 \pm 0.00	2.00 \pm 0.00
1	1.33 \pm 0.67	2.00 \pm 0.00	1.67 \pm 0.33
2	0.00 \pm 0.00	1.67 \pm 0.33	0.67 \pm 0.33
3	-	1.67 \pm 0.33	0.67 \pm 0.33
4	-	1.00 \pm 0.00	0.67 \pm 0.33
5	-	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

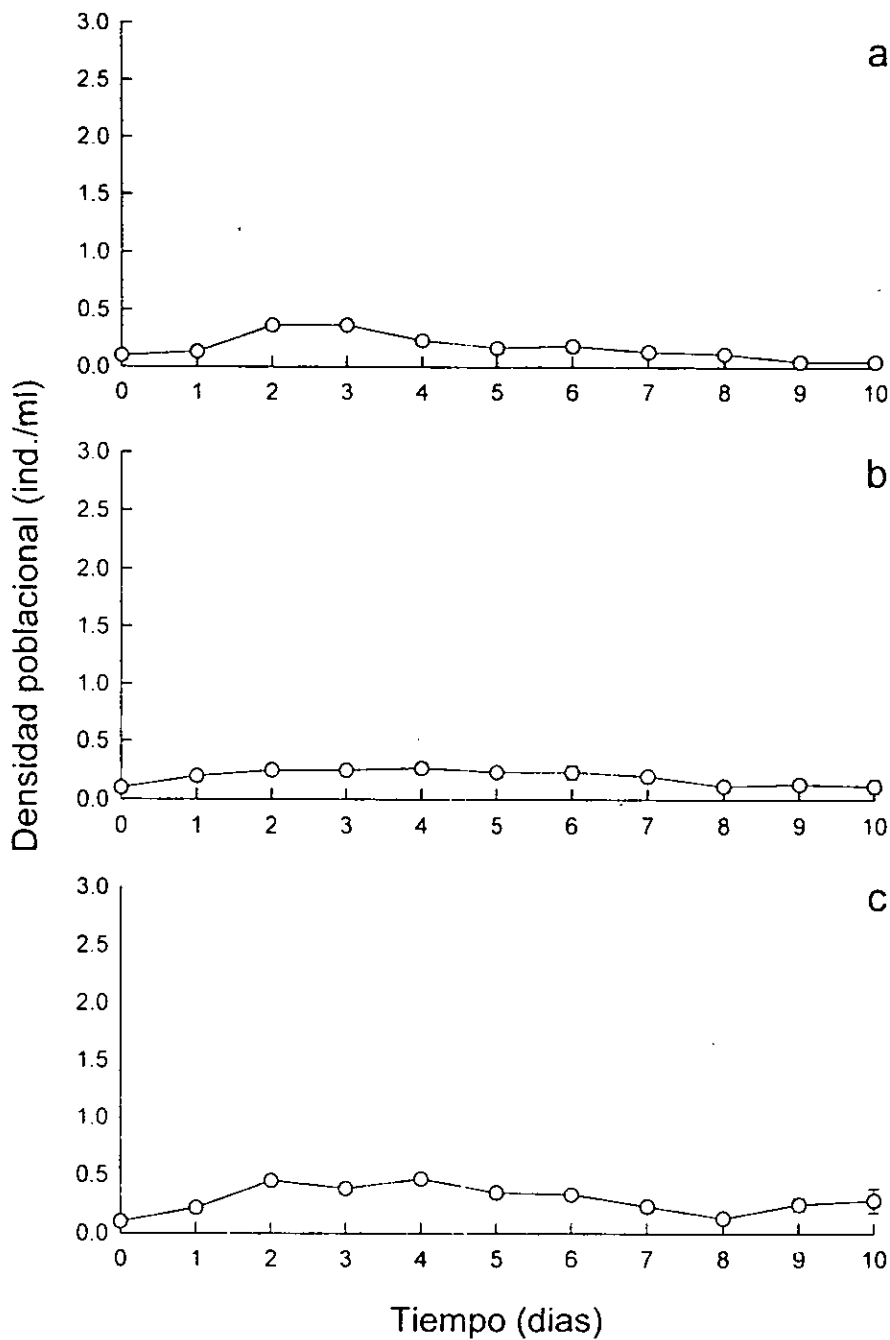


Fig. 8. Curva del crecimiento poblacional de *Asplanchna sieboldi* en relación a la presa (*Brachionus calyciflorus*) a una densidad de 2.5 individuos/ml/24 hr. Se muestran los valores de (promedio \pm error estándar) basados en 3 réplicas registradas. Las leyendas a, b y c, muestran en la presente figura las condiciones alimenticias solo alga, alga + nejayote y solo nejayote, respectivamente, usando el crecimiento de la población de las presas.

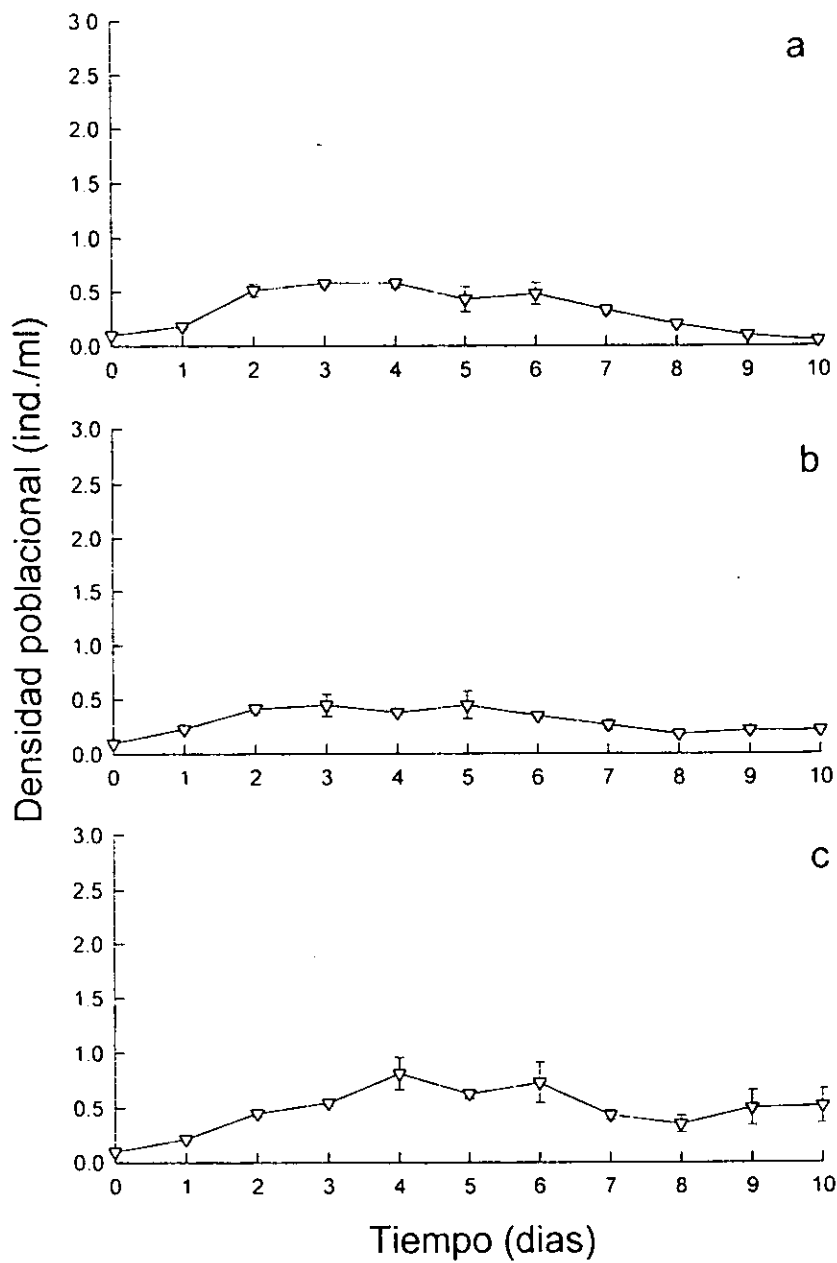


Fig. 9. Curva del crecimiento poblacional de *A. sieboldi* en relación a la presa (*B. calyciflorus*) en una densidad de 5 individuos/ml/24 hr. Los valores mostrados son (promedio \pm error estándar) basados en 3 réplicas registradas. Otros detalles en la Fig. 1

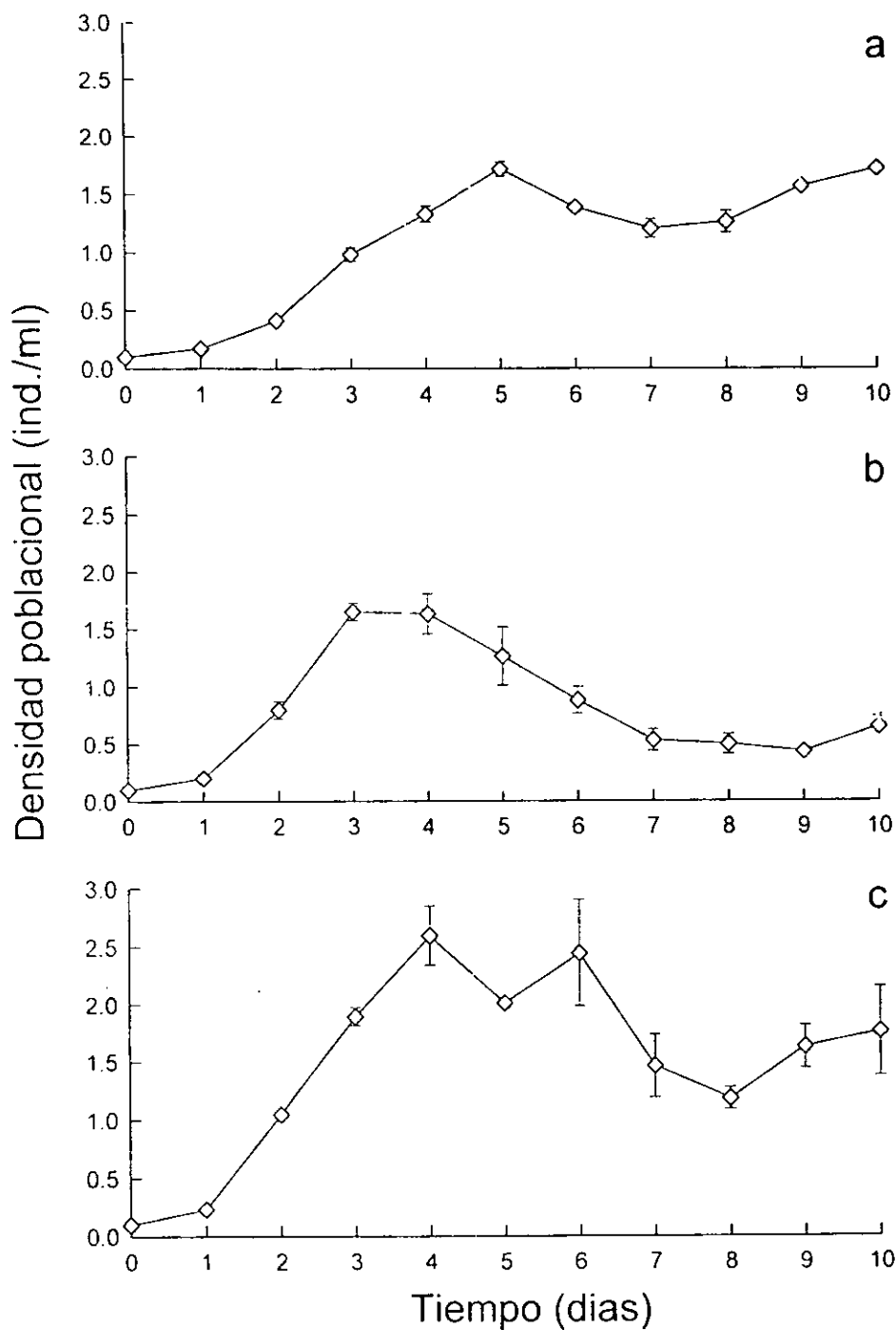


Fig. 11. Curvas del crecimiento poblacional de *A. sieboldi* en relación a la presa (*B. calveiflorus*) a una densidad de 20 individuos/ml/24 hr. Los valores mostrados son (promedio \pm error estándar) 3 réplicas registradas. Otros detalles como en la Fig.1

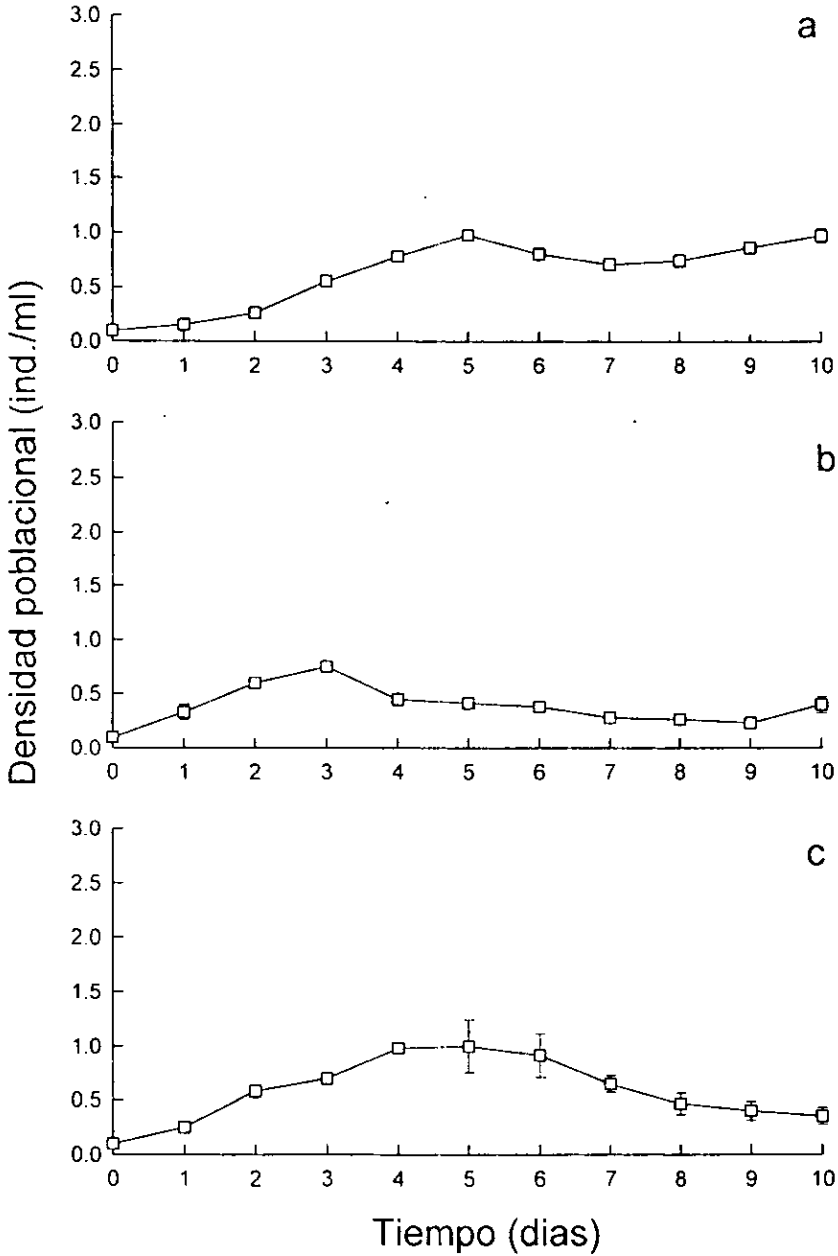


Fig. 10. Curva del crecimiento poblacional de *A. sieboldi* en relación a la presa (*B. calyciflorus*) a una densidad de 10 individuos/ml/24 hr. Los valores mostrados son (promedio \pm error estándar) basados en 3 réplicas registradas. Otros detalles como en la Fig. 1

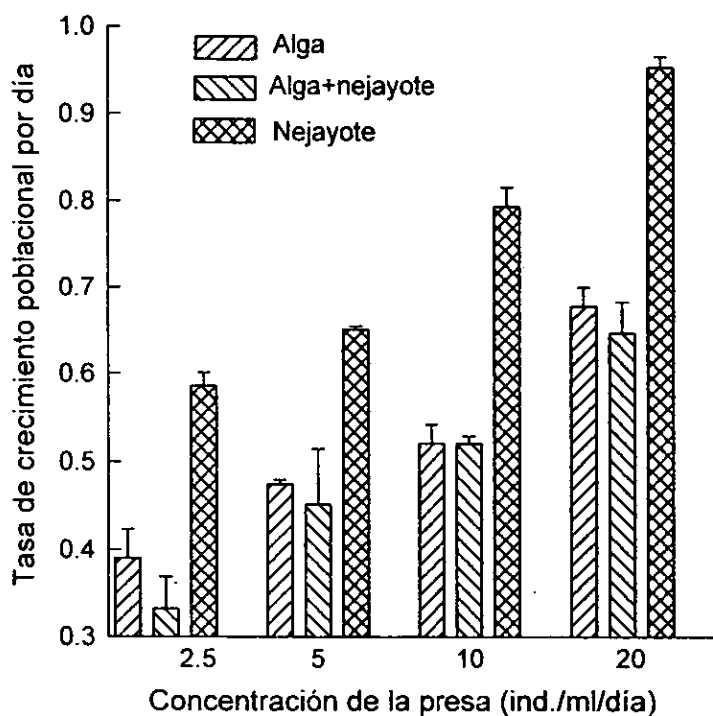


Fig. 12. Proporción del crecimiento poblacional por día (r) en *A. sieboldi* en relación a la densidad de la presa y la calidad nutricional. Cada valor representa el promedio y el error estándar basado en 3 réplicas. El valor de r se deriva usando la ecuación exponencial mostrada en el texto.

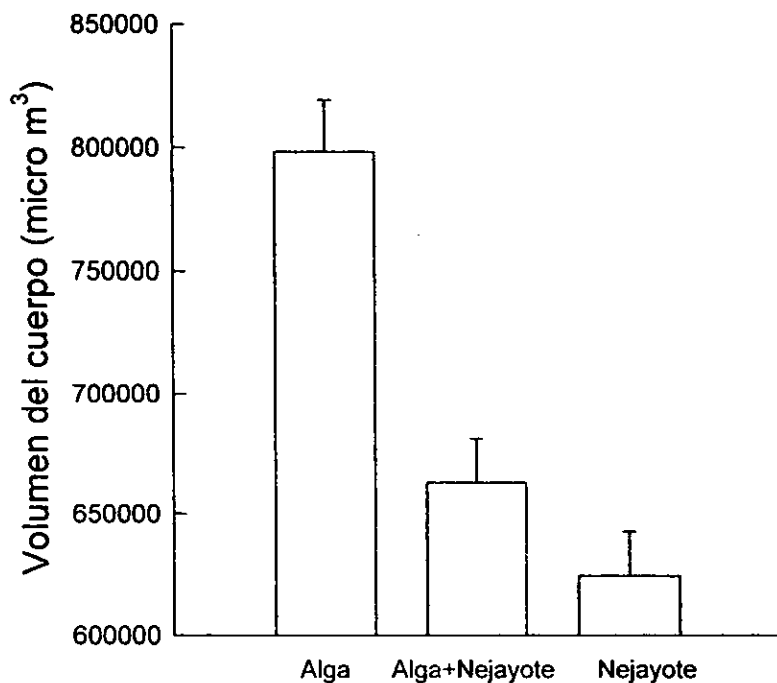


Fig. 13. Volumen del cuerpo (μm^3) del rotífero (*Brachionus calyciflorus*) en relación a los tres tipos de alimento, solo alga (ofrecida diariamente en una proporción de 2×10^6 cels/ml de *Chlorella*), alga más nejayote (50% del 84% dedilución) y solo nejayote (84% diluida con medio EPA). Los valores mostrados son el promedio \pm error estándar basados en 50 observaciones de medidas en diferentes estadios del crecimiento poblacional.

CONCLUSIONES GENERALES

De este trabajo podemos concluir que el nejayote sí puede ser utilizado para la producción de rotíferos, ya que se obtuvo el crecimiento poblacional del rotífero en éste nejayote y que no tiene costo alguno, ya que se tira al drenaje como un producto secundario, sin ser tratado. El rotífero alimentado del nejayote puede ser utilizado en la acuicultura para el desarrollo de larvas de peces y crustáceos. De esta manera se propone la sustitución del alimento tradicional que son las microalgas por el nejayote. El nejayote a una concentración de 8% puede sustituir una concentración del alga de 2×10^6 células ml^{-1} . Capítulo 1

La temperatura óptima para el crecimiento del rotífero se obtuvo a 25°C ya que en esta, se dio un crecimiento poblacional mejor demostrando que es una adaptación natural a las temperaturas templadas, ya que a 30°C se redujo la densidad *C. vulgaris*. Capítulo 2.

La calidad nutricional de los rotíferos utilizados como presas que se alimentaron del nejayote, aunque tuvieron un menor tamaño que los cultivados en *C. vulgaris*, fue buena ya que afecta positivamente en la respuesta numérica de *A. sieboldi* utilizado como organismo de prueba en éste trabajo, por ser un consumidor terciario. Se dio un consistente crecimiento poblacional de *A. sieboldi*, superando en número a los que se alimentaron con *C. vulgaris* a una concentración de 2×10^6 células ml^{-1} .

RECOMENDACIONES

Experimentar con larvas de peces y crustáceos alimentándolos con rotíferos cultivados en nejayote para ver su desarrollo de postlarva a juvenil y compararlo con los rotíferos alimentados con algas.

Probar el empleo de acuarios y estanques de mayor tamaño, en el cultivo de rotíferos con nejayote para conocer el tiempo en que se alcance la densidad poblacional deseada.

Probar el nejayote en otras concentraciones entre 8% y 32% en el desarrollo poblacional de los rotíferos.

Hacer pruebas con la mezcla rotífero + alga, realizando diluciones para saber cuál es la concentración óptima en la cual puede ser utilizada.

APENDICE 1

Población clonal de rotíferos.

Se lleva a cabo utilizando solo un rotífero neonato, que se va a poner en un recipiente pequeño con medio EPA y alimento. Diariamente se cambia al rotífero del medio, filtrándolo con una malla de 40 μ y colocándolo en un recipiente limpio, con medio fresco y alimento fresco. Como la tasa de crecimiento poblacional de los rotíferos es de 1.5 diario en pocos días tendremos una población, que se va incrementando diariamente.

APENDICE 2

Producción de microalga (*Chlorella vulgaris*) en laboratorio**INTRODUCCIÓN**

“Las características deseables de una cepa algal incluyen: 1) un alto valor nutricional, 2) nula toxicidad, 3) fácil acceso de captura y 4) bajo costo de producción. Por otra parte, las cepas utilizadas en sistemas de cultivo a cielo abierto, deben presentar intervalos amplios de respuestas para adaptarse a las variaciones anuales de irradiaciones, temperatura y nutrientes, ya que los cambios de intensidad luminosa pueden inhibir la división celular por insuficiencia ó por exceso. Esta última se manifiesta al sobrepasar la intensidad de saturación (I_s) y por ende, la capacidad fotosintética de la células en cultivo. A su vez la I_s es afectada por la temperatura. Con base en ese parámetro, las cepas pueden clasificarse: en mesofílicas ó termofílicas. Una cepa mesofílica muestra un crecimiento poblacional favorable en todos los meses del año, pero con una disminución en verano. En contraste, las cepas termofílicas presentan gran actividad en los meses de verano, pero no así en invierno. Por lo tanto, para obtener cosechas altas en zonas donde las variaciones de temperatura e intensidad luminosa son amplias durante el año, deben de analizarse: 1) el potencial de diferentes cepas en sistemas de producción y 2) su caracterización a través del tiempo para una mejor selección” (Richmond, 1986).

Se decidió utilizar la especie *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890. con base en sus características poblacionales: 1) rápido crecimiento poblacional, 2) tamaño pequeño. Esta especie habita el mismo medio que el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Con ello se garantiza la alimentación adecuada de este segundo. En Brasil se tienen registros de la presencia de *Brachionus calyciflorus* asociado con la abundancia de clorofíceas, principalmente *Actinastrum spp.* y *Chlorella sp.* (Pavon Meza 1993).

Aislamiento del alga

El alga *C. vulgaris* fue aislada originalmente del lago Chapultepec y mantenida en el acuario de la UNAM Campus Iztacala. Su cultivo masivo se desarrolló con el fin de reconocer su densidad poblacional máxima y el tiempo necesario para alcanzarla.

MATERIAL Y METODO

Mantenimiento de la cepa

El monocultivo fue inoculado en tubos de ensaye mediante la técnica de dilución seriada (1:10 a 1:100). En forma paralela se hicieron inoculaciones en cajas de Petri y tubos de ensaye con medio BOLD BASAL (Apéndice 3) solidificado que, una vez incubadas hasta apreciar crecimiento algal sobre toda la superficie del medio fueron conservadas en refrigeración $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

A partir de la cepa pura se tomó una alícuota, sembrándola en matraces Erlenmeyer de vidrio de 500 ml, con medio BOLD BASAL (Fernández *et al.*, 1996), con la finalidad de propagar las células y posteriormente inocular en recipientes de plástico con una capacidad de 2,000 ml previamente desinfectados por cloración, los cuales contenían un volumen de 1,800 ml de medio BOLD BASAL. Para desarrollar el cultivo masivo, se mantuvo con aireación constante y fotoperiodo de 24 horas. El volumen del medio se mantuvo constante, reponiendo la pérdida por evaporación agregando agua destilada enriquecida con Bicarbonato de Sodio comercial, a una proporción de 1 gramo por litro.

La densidad inicial de *C. vulgaris* sembrada en cada recipiente fue 0.2×10^6 células ml^{-1} . El crecimiento de los cultivos se determinó por duplicado, por conteo directo en la cámara de Neubauer cada 24 horas, durante 16 días hasta llegar a la fase estacionaria. Se calculó el promedio y la desviación estándar de la producción diaria del alga con la finalidad de determinar la curva de crecimiento correspondiente que permitió encontrar la densidad poblacional máxima de algas para alimentar a los rotíferos.

Bajo condiciones de cultivo cerrado, donde los nutrientes para las algas son limitados, el crecimiento algal tiene diferentes fases que son descritas por Fernández *et al.* (1996).

RESULTADOS

Con base en el crecimiento poblacional de *C. vulgaris* se encontró una densidad poblacional máxima de $50.72 \times 10^6 \pm 5.89 \times 10^6$ células ml^{-1} y el tiempo en que ésta se alcanza en el día 16 (ver la figura 14). Se observa que en el cultivo de algas se dió una adaptación, al pasar a un medio BOLD BASAL fresco con nutrientes nuevos, luz (lámpara fluorescente de luz de día de 30 watts) y espacio en la columna de agua que tiene un volumen de 1,800 ml para reproducirse, condiciones diferentes a las que tenía al ser cosechada como la falta de espacio en el volumen de agua saturada por el crecimiento algal, por lo tanto no llegaba la luz a toda el alga.

Se observaron varios picos en el crecimiento poblacional (ver figura 14), pero el máximo se obtuvo al día 16 donde alcanza una densidad de 50.72×10^6 células ml^{-1} y el día 17 llega a la fase de decaimiento debido al agotamiento de los recursos en el medio. Asimismo se incrementó el pH de 7.0 a 9.6, característica en el cultivo de varias especies de microalgas. Debido a la presencia de luz las 24 horas y temperatura constante 24°C , las algas mostraron un crecimiento rápido y una muy buena densidad, este comportamiento, se debió, en parte a la buena calidad de los nutrientes y que fueron añadidos (ver Apéndice 3).

Si las tasas de crecimiento algal son reguladas por los parámetros ambientales y repercuten sobre la productividad del sistema en cultivo, se puede reconocer la influencia de tres parámetros:

La temperatura, 2) la luz y 3) el medio de cultivo. Estos a su vez determinan la variabilidad bioquímica de la microalga, característica que juega un papel importante para establecer el valor nutricional del material algal como una fuente nutritiva probable de proteína, productos químicos ó de alimento en la acuicultura.

DISCUSIÓN

La curva de crecimiento obtenida en el cultivo no axénico para *C. vulgaris* describió las fases comunes que, de acuerdo con Fogg (1975), corresponden a los cultivos de volumen limitado o cultivo por lotes. No hubo fase de inducción ó de retraso que fuera significativa. Con células viables y un cambio en los parámetros del medio, tales como el espacio y la luz principalmente, comenzó inmediatamente la fase exponencial en la cual la multiplicación celular es rápida, donde se duplica la población diariamente y el número se incrementa diariamente en progresión aritmética.

De los 8 recipientes inoculados se obtuvieron exitosamente 5, la pérdida de tres recipientes fue debido al manejo, ya que al agregar agua con bicarbonato de sodio, el volumen del recipiente se excedió, siendo esto una fuente de contaminación para el alga, (en el recipiente se pegan las algas y éstas son atacadas por ciliados y esporas de hongos que se encuentran en el ambiente).

De acuerdo con Richmond (1986), en la mayoría de las microalgas la constante relativa de crecimiento (r) muestra algunas de las interacciones entre la intensidad luminosa y la tasa de fotosíntesis. Esta se incrementa de manera proporcional al aumentar la intensidad luminosa y la temperatura; no obstante, cuando los valores de saturación son alcanzados, decae.

Por lo tanto, las velocidades máximas de crecimiento pueden lograrse a intensidades próximas a las de saturación de la población de microalgas, lo cual depende de la capacidad intrínseca de las especies y cepas de cultivo. Es posible inferir que, al encontrar los valores próximos a la intensidad de saturación para la cepa, se incrementa la velocidad de crecimiento y el número de divisiones celulares (Vega Quintero, 1996).

CONCLUSIONES

En el cultivo mantenido en condiciones de fotoperiodo y temperatura constantes se obtuvo un buen crecimiento del alga en pocos días alcanzando en los recipientes densidades poblacionales altas, comparado con el trabajo de Vega Quintero (1996). Ya

que el alga es de buena calidad y se adapta rápida y fácilmente a su nuevo medio, no se dió un lapso de tiempo muy grande para la adaptación e inició el crecimiento poblacional al ser re sembrada.

REFERENCIAS

Arrijoja, R.V., 1982. Aislamiento, purificación y caracterización parcial de una cepa de una alga verde-azul fijadora de Nitrógeno. *Nostoc sp.* Tesis profesional. ENCB-IPN. México. 81 pp.

Borowitzka, M.A. y Borowitzka L.J., 1988. "Micro-algal biotechnology" Cambridge University Press, London.

Fernández, *et al*, 1996. International Workshop in Culture Rotifers Systems UNAM Campus Iztacala.

Fogg, G.E., 1975. Algal cultures and phytoplankton ecology. Second edition. University of Wisconsin Press, London. pp.12-36.

Pavon Meza, E. L., 1993. Desarrollo de una técnica de cultivo para la reproducción masiva del rotífero. Tesis profesional UNAM Campus Iztacala. 44 pp.

Richmond, A., 1986. Microalgae of economic potential. In: Richmond, A. (Ed.). Handbook of microalgal mass culture. CRC Press Florida, pp. 119-235.

Vega Quintero, Ma.S., 1996. Caracterización y análisis bromatológico de una cepa monoalgal *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Colectada de la atmósfera con posible uso en acuicultura. Tesis profesional UNAM Campus Iztacala. 68 pp.

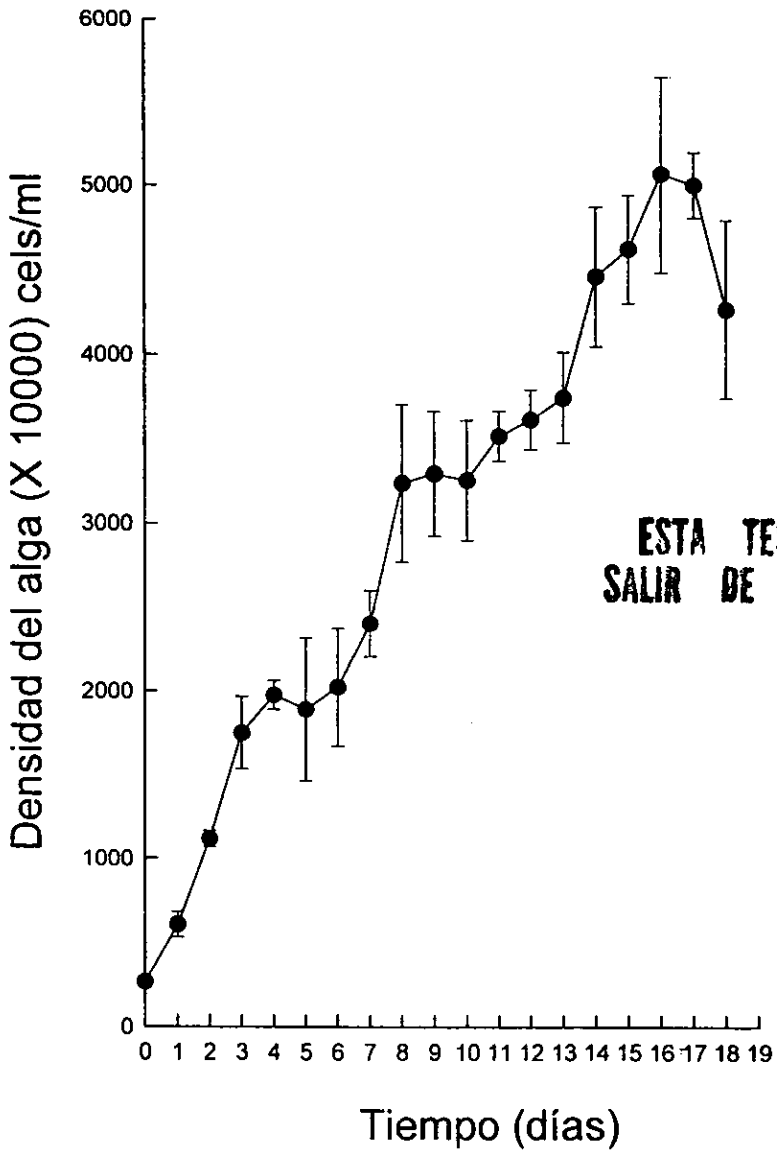


Fig. 14. Crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* en medio BOLD BASAL líquido con un fotoperíodo de 24 horas

APENDICE 3

Medio Bold Basal para el cultivo de algas verdes (Borowitzka & Borowitzka, 1988).

Seis soluciones stock (en agua destilada ó deionizada) la siguiente lista de sales es para preparar 400 ml.

NaNO_3	10.0g
$\text{CaCl}_{2 \cdot 2}\text{H}_2\text{O}$	1.0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0g
K_2HPO_4	3.0g
KH_2PO_4	7.0g
NaCl	1.0g

A 940 ml de agua destilada añada 10 ml de cada solución stock y 1.0 ml de elementos de transición en solución stock:

1) 50 g. de EDTA y 31 g. de KOH (ó 50 g. de Na_2EDTA) disuelto en 1 lt de agua destilada.

2) 4.98 g. de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 1 litro de agua acidificada (agua acidificada: 1 ml de H_2SO_4 disuelto en 1 lt de agua destilada).

3) 11.42 g. de H_3BO_3 disuelto en litro de agua destilada.

4) Las siguientes sales se suman, disueltas en 1 lt. de agua destilada:

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.82 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.44 g
MoO_3	0.71 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.57 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.49g

Ajustar el pH a 7.0 antes del Autoclave por 20 minutos, a una presión de 15 pulgadas/ cm³ y temperatura de 230°C.

El medio BOLD BASAL usado como sustrato en todas las fases experimentales se preparó a partir de soluciones patrón mantenidas en refrigeración.