



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Efectos en el crecimiento poblacional y en la composición
bioquímica de *Brachionus calyciflorus* alimentado con
Chlorella vulgaris cultivada en concentraciones bajas de
Nitrógeno y Fósforo.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

Vázquez Hernández Zaida Irais



Director: Dr. Luis Héctor Hernández Hernández
Tlalnepantla, Edo. De México.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mi Mami, que a pesar de que he fallado sigue dándome todo su apoyo. Perdóname porque no soy como quisieras. Gracias por todo.

Iris, gracias porque nunca me has negado nada y aunque te he decepcionado infinidad de veces, siempre estas ahí para sacarme adelante.

A mi Papá, gracias por los momentos felices de mi Infancia y por llevarme hasta aquí.

Para los abuelos (Sofi, Mina y Pepe †) por apapacharme y consentirme siempre; además de darme unos padres maravillosos.

A los buenos amigos y de años que siempre están para los ratos malos y las fiestas

locas: Arthur (Rey), Fer, Miguel, Sauri, Jorge, Manuel, Chelo, Sara e Itzel (Uvas).

Gracias a los profesores del Laboratorio por darme la oportunidad de llevar a acabo

este proyecto: M. en C. Mario Fernández Araiza, Dr. Luis Héctor Hernández, Biol.

Omar Ángeles López

A mis sinodales, por sus sugerencias y aportaciones para mejorar el proyecto.

Para los amigos del Acuario: Moni, Rafa, Carlos, Alberto, Marco, Gerardo, Ariel...

Para la pandilla del poli (ji) Diego, Alex Samayoa y Alex...

Y también a los amigos que me acompañaron en mi formación en la Universidad:

Mari (Madre), Augusto, Catriona, Osiris (la banda)...Ricardo Daniel...

Gracias a todos por compartir una parte de su tiempo en esta etapa fabulosa de

Mi Vida, pero en especial a Mi Familia.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	9
OBJETIVOS	12
JUSTIFICACIÓN	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	34
ANEXOS	35
LITERATURA CITADA	40

RESUMEN

Los rotíferos son ampliamente utilizados en la acuicultura como alimento vivo, particularmente durante los primeros estadios de peces y crustáceos de importancia comercial. Una forma de lograr que los rotíferos cumplan con requerimientos nutricionales es el enriquecimiento a largo plazo con microalgas. En este trabajo se evaluó el crecimiento poblacional y la composición bioquímica del rotífero *Brachionus calyciflorus* alimentado con la microalga *Chlorella vulgaris*; la cual fue cultivada a concentraciones bajas de (1.25 y 0.625mg/L) N y de P. Los cultivos de la microalga fueron estáticos y por triplicado, con aireación e iluminación continua. Diariamente se tomaron alícuotas del cultivo de rotíferos para determinar la densidad poblacional y calcular la tasa de crecimiento. Se obtuvo la biomasa necesaria para realizar análisis de composición bioquímica, contenido de Humedad y Cenizas (AOAC), Lípidos (Bligh and Dryer) y Proteínas (Micro – Lowry). Los resultados muestran que el P no limita el crecimiento poblacional de *C. vulgaris* y su composición proximal refleja un aumento en proteínas y lípidos; *B. calyciflorus* al ser alimentado con la microalga cultivada a una concentración de 1.25mg/L de P obtuvo mayor crecimiento poblacional y su composición bioquímica se ve ligeramente modificada con aumento en el contenido de proteína y lípidos. Los tratamientos con baja concentración de N en *C. vulgaris* resultaron con un alto contenido de lípidos, el cual se vio reflejado en el contenido de *B. calyciflorus* pero el crecimiento poblacional resultó ser mas bajo (0.34 ± 0.005).

INTRODUCCIÓN

La producción de alimento vivo es una de las partes esenciales del desarrollo de los primeros estadios de vida de las especies acuáticas de importancia comercial. Se sabe que el cultivo de peces marinos, en la primera alimentación de las larvas es importante proporcionar rotíferos de alta calidad nutricional, ya que su uso permite el óptimo crecimiento y supervivencia de los mismos (Brown, 2002)

Indudablemente, uno de los requisitos principales para el éxito de la acuicultura es el continuo suministro de los estadios tempranos de los organismos en cultivo (semilla). El desarrollo y sobrevivencia de estos primeros estadios de desarrollo de las especies en cultivo, depende de la calidad del alimento que reciben. En la mayoría de las especies cultivadas a nivel mundial, se utiliza de forma continua el alimento vivo, particularmente rotíferos y nauplio de *Artemia* (Sarma, 1991). A su vez, la calidad nutricional de estos organismos está limitada por el alimento que consuman y es bien conocido que la utilización de microalgas en los criaderos de peces es necesaria para el mantenimiento de la calidad nutricional (Muller-Feuga, 2000).

Las microalgas, se utilizan tanto de una forma directa para la nutrición de las especies criadas en acuicultura, como para alimentar aquellos animales que servirán a su vez de presas (Arredondo y Flores, 1992). La variación de las condiciones de cultivo, tales como el tipo y concentración de nutrientes, temperatura, pH, fotoperíodo,

manipulación genética, entre otros han contribuido a establecer sistemas dirigidos hacia la obtención de biomasa microalgal (Rioboo *et al.*, 2003).

Realizando cuidadosamente una selección de distintas microalgas se puede ofrecer una excelente calidad nutricional para estadíos larvales, también directa o indirectamente enriqueciendo el zooplancton (Brown, 2002). Diferentes factores influyen que una especie de microalga sea adecuada como alimento para los rotíferos incluyendo tamaño, forma, digestibilidad (Suchar y Chigbu, 2006).

Los valores nutricionales en el plancton pueden verse afectados por diferentes concentraciones de Nitrógeno sobre el intervalo de crecimiento y composición de ácidos grasos; en las microalgas pueden acelerar su crecimiento o lo contrario según la fuente de nitrógeno que este disponible y por tanto variar la cantidad de proteína contenida (Nianjun *et al.*, 2001). También un elemento esencia es el Fósforo, pues forma parte de componentes fundamentales que constituyen los ácidos nucleicos y fosfolípidos.

Entre diversos grupos de fitoplancton, las especies de algas verdes, especialmente *Chlorella* y *Scenedesmus*, son ampliamente utilizadas para el crecimiento de zooplancton bajo condiciones de laboratorio y naturales (Sarma *et al.*, 2001). Actualmente, *C. vulgaris* representa un sistema biológico ideal para diferentes líneas de investigación y además presenta una alta eficiencia por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio. Además esta microalga proporciona otros nutrientes tales

como vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) esenciales, pigmentos y esteroides.

Los sistemas de producción de *C. vulgaris* generalmente son de forma intensiva; se llevan a cabo en laboratorios donde los organismos se mantienen con la calidad y cantidad necesaria de alimento (Bold y Wynne, 1985). Además, los cultivos de ésta pueden ser axénicos o no axénicos.

Cuando las microalgas están asociadas a bacterias en la naturaleza, se ejerce una interacción que puede ser beneficiosa para ambos; de tal manera que la microalga es capaz de asimilar productos de la actividad bacteriana en el medio. En condiciones axénicas, las microalgas no llegan a alcanzar un crecimiento óptimo, por carecer de actividad microbiana asociada; la cual le aportará factores esenciales para estimular el crecimiento (Reynolds, 1984). Los cultivos no axénicos en los cuales se mantiene la actividad bacteriana asociada pueden ser seleccionados para acuicultura, nutrición animal o para biofertilizantes (Moronta *et al.*, 2006).

En condiciones de laboratorio, las cepas de microalgas axénicas son de suma importancia desde el punto de vista fisiológicos ya que permiten explicar si la microalga posee o no mecanismos que le permitan regular condiciones ambientales estresantes, tales como elevada salinidad, cambios en pH (ácido o básico), elevación de la temperatura, limitación de nutrientes, entre otros (Moronta *et al.*, 2006).

La composición nutricional de las microalgas es determinante para el zooplancton, que se compone principalmente de protozoos, rotíferos, copépodos y cladóceros. Estos son básicamente consumidores primarios y secundarios y juegan un papel de transferencia de energía en la cadena trófica de los ecosistemas (Thorp y Covich, 1991).

Particularmente, el uso de rotíferos es significativo para la acuicultura pues se ha demostrado que son altamente nutritivos para larvas de peces, moluscos y crustáceos; y su composición bioquímica puede ser mejorada mediante dietas especiales (Franco, 2003). Adicionalmente, algunas especies de rotíferos pueden ser fácilmente cultivadas, obteniendo densidades hasta de 100,000 individuos por litro, por lo que suelen ser uno de los componentes más importantes de la dieta de larvas de peces comerciales (Nogrady *et al.*, 1993).

Existen alrededor de 2000 especies (Serrania, 1996), la mayoría de los rotíferos libres son omnívoros; alimentándose de todos los miembros del plancton, principalmente material detrítico y de pequeñas algas (Margalef, 1983). Viven generalmente entre una o dos semanas, que se pueden prolongar en ciertos casos hasta el mes, bajo condiciones favorables (Nogrady *et al.*, 1993). Los rotíferos del género *Brachionus* son ampliamente usados como alimento en estadios larvales de peces, camarones, bivalvos, moluscos (Franco, 2003) y son un eslabón muy importante en la cadena, ya que proporcionan un nivel alto de nutrientes a sus consumidores.

ANTECEDENTES

Morris *et al.*, (1999) estudiaron la composición bioquímica y las características del perfil aminoacídico de la microalga *C. vulgaris* y evaluaron su calidad proteica. La biomasa de esta especie resultó con un elevado contenido de proteína verdadera y bruta, entre el 30 y 40%, respectivamente; determinando que constituye una fuente alternativa de posible utilización como suplemento nutricional. El patrón de aminoácidos resultó con todos los aminoácidos esenciales.

Isik *et al.*, (1999) analizaron el contenido de ácidos grasos en la larva de *Tilapia zilli*, en el rotífero *B. calyciflorus* y en las microalgas *Scenedesmus abundans*, *Monoraphidium minutum* y *C. vulgaris*. Obtuvieron que *C. vulgaris* tuvo un alto contenido de lípidos mas que las otras dos microalgas pero no hubo un reflejo en el contenido de lípidos de *B. calyciflorus*. Lo mismo resulto en el contenido de ácidos grasos a pesar de que *C. vulgaris* obtuvo un mayor contenido de estos no hubo dominio en el rotífero y en la larva tampoco se obtuvo un contenido alto de lípidos y por lo tanto de ácidos grasos fue mínimo.

Nianjun Xu *et al.*, (2001) llevaron a cabo un estudio para observar los efectos de diferentes tipos de nitrógeno y concentraciones del mismo sobre el rango de crecimiento y composición de ácidos grasos en una microalga marina *Ellipsoidion sp.* El alga creció pobremente en medio libre o medio con urea. En la misma fase en medio con amonio resultó un alto rendimiento en lípidos totales, pero en medio EPA no hubo diferencias significativas en el rendimiento al usar un medio con nitrato. El más alto contenido

expresado en porcentaje de ácidos grasos fue de 27.9% en medio EPA y 39% en medio con amonio.

Brown (2002) realizó una revisión acerca del uso de microalgas en acuicultura, basándose en su valor nutricional y transferencia de nutrientes a la cadena. Las especies de microalgas pueden variar significativamente en sus valores nutricionales, y de esta forma cambiar las diferentes condiciones de cultivo. En la fase de crecimiento logarítmico tardío el alga contiene típicamente 30 a 40% de proteínas, 10 a 20% lípidos y 5 a 15% carbohidratos. Cuando el cultivo atraviesa la fase estacionaria, la proximidad de composición de la microalga puede variar significativamente, cuando el nitrato es limitado, los carbohidratos pueden duplicar a las proteínas.

Piorreck *et al.*, (2002) cultivaron dos algas verdes (*C. vulgaris* y *S. obliquus*) y cuatro algas verdeazules en diversas concentraciones de nitrógeno. En todas las algas con el aumento de concentración de N condujo a un aumento en la biomasa (de 8 a 450 mg/l), en contenido proteínico y en clorofila. En los niveles bajos de N, las algas verdes tuvieron un alto porcentaje de los lípidos totales (45% de la biomasa). Más del 70% de éstos eran lípidos neutrales tales como triacilgliceroles. En los niveles altos de N, el porcentaje de lípidos totales estuvo cerca del 20% del peso seco.

Flores – Burgos *et al.*, (2005) evaluaron el efecto de dos dietas de algas (*C. vulgaris* y *S. acutus*) ofrecidos sola y en combinación, se proporcionaron como alimento a dos especies de rotíferos (*B. calyciflorus* y *B. patulus*) Cualquiera que fuese la

combinación de algas, el aumento de la tasa poblacional de *B. patulus* fue menos de la mitad que para *B. calyciflorus*. Al ofrecer solo *C. vulgaris* se obtuvo la densidad más alta.

Alva – Martínez *et al.*, (2007) Evaluaron a la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* como dieta, por separado y junto con *C. vulgaris* en diferentes proporciones (0, 25, 50, 75 o el 100 % de la biomasa) sobre el incremento poblacional de dos especies de rotíferos. *B. calyciflorus* y *B. havanaensis*. En tratamientos que contienen exclusivamente dietas de *Chlorella* y aquellas con proporción baja de *Microcystis*, *B. havanaensis* fueron más abundantes que *B. calyciflorus*. Ambas especies de rotíferos murieron en menos de dos semanas con una dieta exclusiva de *M. aeruginosa*. Las densidades de población máximas de *B. calyciflorus* cultivado sobre una dieta exclusiva de *Chlorella* fue 47 ± 6 ind/ml. Los valores correspondientes para *B. havanaensis* fueron más altos 203 ± 21 ind/ml.

Kennari *et al.*, (2008) utilizaron *Chlorella sp* y *Scenedesmus obliquus* como alimento de *B. calyciflorus* Pallas, a tres diferentes concentraciones, para analizar el crecimiento y la composición de ácidos grasos que estas brindaban al rotífero. Obtuvieron mejores resultados con *C. sp* en crecimiento poblacional con mas de 400ind/ml y resultaron con un alto contenido de PUFA esenciales, mejor y mayor que *Scenedesmus*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos en el crecimiento poblacional y en la composición proximal del rotífero *Brachionus calyciflorus* alimentado con la microalga *Chlorella vulgaris* cultivada a diferentes concentraciones de N y P.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la composición proximal (proteínas, lípidos, cenizas y humedad) de *C. vulgaris* en cada concentración de N y P.
- Evaluar el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* alimentado con *C. vulgaris* cultivada en las diferentes concentraciones de N y P (2.5, 1.25 y 0.625mg/L)
- Evaluar la composición proximal (proteínas, lípidos y humedad) de *B. calyciflorus* alimentado con *C. vulgaris* cultivada en las diferentes concentraciones de N y P (2.5, 1.25 y 0.625mg/L)

JUSTIFICACIÓN

La producción de alimento vivo es una de las partes esenciales del cultivo de los primeros estadios de desarrollo de las especies acuáticas de importancia comercial. Sin embargo, el costo de producción es muy alto, tanto en mano de obra. Debido a ello, se busca optimizar los cultivos de apoyo, sin afectar su producción y calidad nutricional.

Por lo anterior, en este trabajo se cultivó la microalga *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de N y P para determinar los efectos en el crecimiento poblacional y composición proximal del rotífero *Brachionus calyciflorus* al ser alimentado con la microalga y así proponer hasta donde es conveniente disminuir las concentraciones de N y P.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en el Laboratorio de Producción Acuícola (Acuario). En dos etapas: la primera fue la producción de biomasa algal en diferentes concentraciones de nutrientes utilizando la microalga *C. vulgaris* la cual es mantenida en este Laboratorio, y la segunda etapa: Cultivo del rotífero *B. calyciflorus* que se obtuvo del Laboratorio de Zoología Acuática de la Unidad de Morfofisiología de la FES - Iztacala.

1. Cultivo y crecimiento poblacional de *C. vulgaris*

Para cultivar a *C. vulgaris* en concentraciones bajas de N y P se eligieron reducciones del 50 y 75% del total reportado para cada nutriente en el medio Bold basal. Así, se determinaron 4 grupos experimentales con concentración final de 1.25 y 0.625 mg/L para N y de P y un grupo control

Se determinó el crecimiento poblacional en las diferentes concentraciones de N y P, con cultivos estáticos en reactores de 2L de capacidad, conteniendo 1.85L de medio preparado con agua destilada. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ \text{C}$), con aireación constante, iluminación continua suministrada por 2 lámparas de luz de día de 30w cada una (intensidad luminosa de $57 \mu\text{mol/m/s}$). Cada tercer día se agregó agua destilada con 1g/L de bicarbonato de Sodio (NaHCO_3) para recuperar la pérdida de medio por evaporación. El crecimiento poblacional se evaluó diariamente,

utilizando como indicador del crecimiento poblacional, la concentración de clorofila total de acuerdo a la técnica reportada por Becker (1994) ^{ANEXO}. Todos los cultivos se iniciaron con una concentración promedio de clorofila de 7.2mg/L, y cada tratamiento se realizó por triplicado. El crecimiento se registro hasta que la cantidad de clorofila empezó a disminuir. Los datos de contenido de clorofila se graficaron contra el tiempo y se obtuvieron el tipo de crecimiento y la tasa de crecimiento poblacional (k) para cada grupo experimental y grupo control:

$$k = c - b / t$$

Donde:

k = tasa de crecimiento

c = Concentración de Clorofila total

t = tiempo (días)

b = Concentración de Clorofila inicial

(Durán *et al.*, 2003)

2. Obtención de biomasa microalgal

Para la obtención de la biomasa necesaria para alimentar a los rotíferos y realizar los análisis bioquímicos, se cultivaron las microalgas bajo las mismas condiciones mencionadas. Los cultivos se mantuvieron hasta que alcanzaron su máxima densidad poblacional en aproximadamente dos semanas, posteriormente los reactores se refrigeraron (a 4°C) hasta que la mayor parte de la biomasa se sedimentó. Se decantó la

mayor cantidad de medio posible, la microalga se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos; resuspendiendo la pastilla con agua destilada (Lucía – Pavón *et al.*, 2001). Una parte de la biomasa colectada se almacenó a 4°C para alimentar a los rotíferos y la otra se utilizó para los análisis proximales, colocándola en crisoles de porcelana y secada a 60° C durante 24hrs (AOAC, 1990)

3. Cultivo y crecimiento poblacional de *B. calyciflorus*

El cultivo de rotíferos se llevó a cabo en vasos transparentes de 65ml conteniendo 50ml de medio EPA (Weber, 1993). En cada recipiente, se colocó una densidad inicial de 1 individuo por cada mililitro se alimentaron con una concentración de 1×10^6 células de *C. vulgaris* /mL (Pavón- Meza *et al.*, 2007), cultivada previamente en las distintas concentraciones de N y P. los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ$ C), con iluminación continua por lámparas fluorescentes de luz blanca de 30 w (intensidad luminosa de $57 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$). Se establecieron 4 repeticiones por tratamiento.

El crecimiento poblacional se determinó por conteos diarios manuales, que durante los primeros días se realizaron en el volumen total del recipiente, pero conforme la población aumentó en número, se tomaron muestreos de 5 alícuotas de 1ml cada una por recipiente. Los conteos se realizaron hasta que cada tratamiento alcanzó su máxima densidad alrededor de 2 semanas, se calculó la tasa de crecimiento (r) de la población, de acuerdo al siguiente modelo:

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

Donde:

r: tasa de crecimiento

No: densidad poblacional inicial

Nt: densidad poblacional en el tiempo (t).

t: tiempo en días

(Wetzel, 1981)

4. Obtención de biomasa de zooplancton

Para realizar los análisis bioquímicos de la biomasa de rotíferos, los cultivos se escalaron hasta un litro y obtener biomasa suficiente. Después de 15 días de cultivo, los rotíferos se colectaron mediante una malla de 50 µm y la biomasa obtenida se lavó con agua destilada y se secó en crisoles de porcelana por 24hrs a 60° C, AOAC (1990)

5. Análisis proximales

La cuantificación del contenido de humedad y cenizas fue por los métodos descritos por la AOAC (1990), de acuerdo a las siguientes formulas:

Humedad (%) = $(1 - \text{peso de la muestra base} / \text{peso de la muestra base húmeda}) \times 100$

Cenizas (%) = $(\text{peso de cenizas} / \text{peso de la muestra base seca}) \times 100$

La cuantificación de proteína se realizó por triplicado con la técnica de Lowry, utilizando un kit de determinación de proteína total Micro-Lowry modificación de Peterson's (TP0300-1KT, Sigma)

La determinación de lípidos totales se utilizó la técnica de Bligh and Dryer (1959), considerando la siguiente fórmula:

$\% \text{ Lípidos totales} = (\text{peso total de lípidos} / \text{peso seco de la muestra}) \times 100$

6. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis (Durán *et al.*, 2003), para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento poblacional y la composición bioquímica de *C. vulgaris* y de *B. calyciflorus*, entre los distintos grupos experimentales y el grupo control, con un nivel de significancia de $P < 0.050$.

RESULTADOS

1. Crecimiento poblacional de la microalga

En la Tabla 1 se muestran las tasas de crecimiento poblacional (k) del cultivo de *C. vulgaris* en los distintos tratamientos con bajas concentraciones de N y P, así como del grupo control. La tasa de crecimiento poblacional de *C. vulgaris* cultivada en la concentración más baja de N (0.625mg/L) fue significativamente más baja cuando se comparo con el grupo control y la concentración de 1.25 mg/L de N. No se observaron diferencias significativas entre los tratamiento con P, aunque los tratamientos con baja concentración de P presentaron tasas de crecimiento más altas que la obtenida para el grupo control.

Tabla 1. Tasas de crecimiento poblacional promedio (k) \pm DS de *C. vulgaris* cultivada en diferentes concentraciones de N y P. *Valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$)*

Tratamiento (mg/L)	P	N
Control (2.5)	4.7 \pm 0.1a	4.6 \pm 0.2a
1.25	5.3 \pm 0.4a	4.1 \pm 0.3a
0.625	5.1 \pm 0.1a	3.7 \pm 0.1b

En la Figura 1 se observan las curvas de crecimiento poblacional de *C. vulgaris* de los tratamientos con 1.25 y 0.625 mg/L de N, así como del grupo control. La cuantificación de clorofila total se ajusta a un modelo lineal. Ambos tratamientos con bajas concentraciones de N resultaron con un crecimiento poblacional menor al del grupo control, y por tanto existieron diferencias estadísticamente significativas.

En la Figura 2 se muestran las curvas de crecimiento poblacional de *C. vulgaris* de los tratamientos con 1.25 y 0.625 mg/L de P, así como del grupo control. Al igual que los tratamientos con N, se ajustaron a un modelo lineal. En estos tratamientos con disminución de P no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las curvas de crecimiento.

2. Análisis proximal de *C. vulgaris*

En la Tabla 2 se muestran los valores de contenido de proteína, lípidos, humedad y cenizas de la biomasa de *C. vulgaris* cultivada en diferentes concentraciones de N y P. Los contenidos de proteína de los grupos experimentales fueron significativamente más bajos cuando se compararon con el grupo control. Respecto al contenido de lípidos, se observaron valores significativamente más altos que el observado para el grupo control; mientras que los tratamientos con disminución de P mostraron valores significativamente más bajos que el observado en el grupo control. El contenido de humedad de los tratamientos con disminución de N en el medio de cultivo, fueron significativamente más bajos que el resto. No se observaron diferencias en el contenido de cenizas entre los grupos.

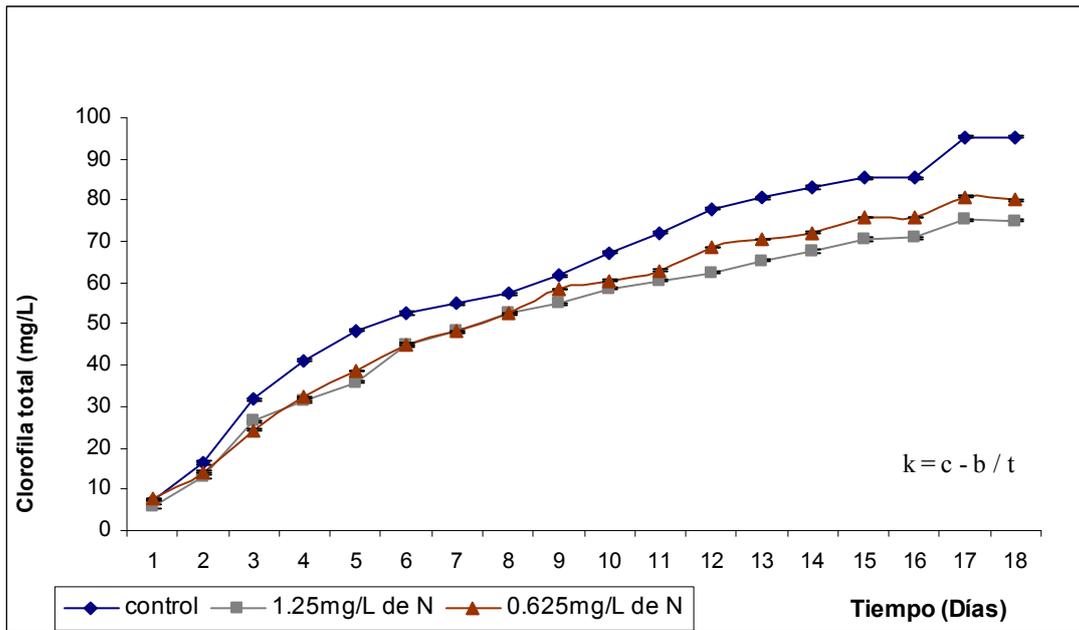


Figura 1. Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* (mg/L de clorofila total) cultivada en diferentes concentraciones de N en el medio.

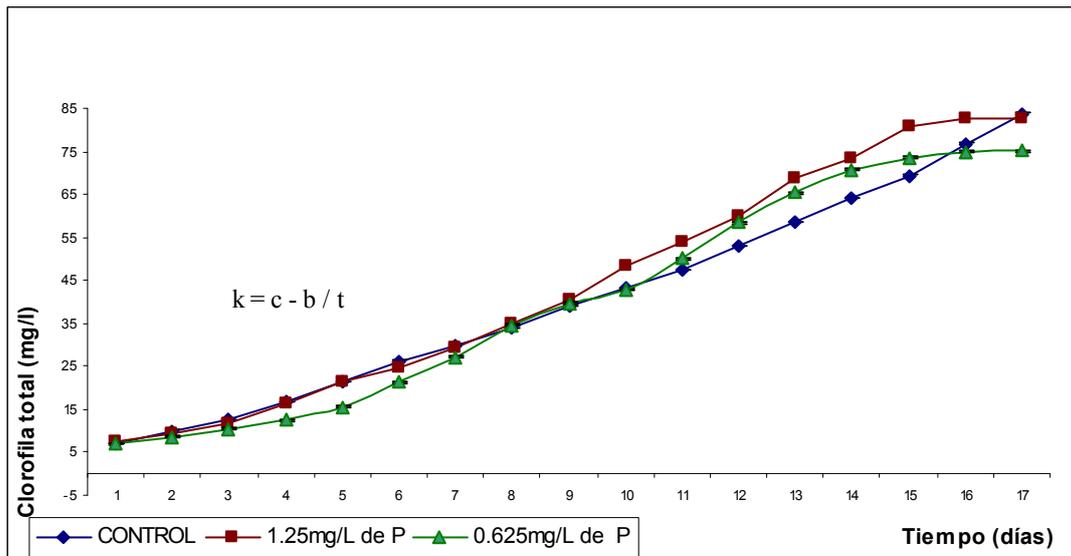


Figura 2. Crecimiento poblacional de *C. vulgaris* (mg/L de clorofila total) cultivada en diferentes concentraciones de P en el medio.

Tabla 2. Valores porcentuales promedio \pm DS de humedad, cenizas, lípidos y proteína de la biomasa de *C. vulgaris* cultivada en diferentes concentraciones de P y N. Valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Tratamiento (mg/L)	Humedad%	Cenizas ¹	Lípidos ¹	Proteínas ¹
0.625 de P	91.3 \pm 0.01a	7.9 \pm 0.01a	4.6 \pm 0.01a	34.7 \pm 6.9a
1.25 de P	90.3 \pm 0.05a	7.2 \pm 0.006a	7.1 \pm 0.02b	37.8 \pm 11.8a
0.625 de N	68.8 \pm 0.03b	9.0 \pm 0.005a	28.7 \pm 0.02c	39.5 \pm 2.7a
1.25 de N	75.9 \pm 0.05b	8.9 \pm 0.005a	25.1 \pm 0.03c	41.1 \pm 4.5a
Control (2.5)	90.4 \pm 0.07a	9.2 \pm 0.02a	8.1 \pm 0.01b	57.8 \pm 7.6b

¹ % determinado en base seca

3. Crecimiento poblacional de *B. calyciflorus*

La tabla 3 muestra las tasas de crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* alimentado con los distintos tratamientos. Se observan valores significativamente más altos en los rotíferos alimentados con *C. vulgaris* cultivada en los tratamientos con disminución de P, que el observado para el grupo control. Se observa que existen diferencias significativas entre las tasas de crecimiento poblacional del grupo control y los tratamientos con disminución de N, pues estos tratamientos presentaron las tasas más bajas.

La Tabla 4 muestra las densidades máximas poblacionales promedio de *B. calyciflorus* obtenidas por tratamiento y el día en el cual se alcanzó. Como se puede

observar el tratamiento de N a una concentración de 1.25mg/L obtuvo la mayor densidad en 12 días, seguido del tratamiento con P a 0.625mg/L en 11 días; el grupo control y el tratamiento con P a 1.25mg/L obtuvieron menor densidad poblacional.

Tabla. 3. Tasas de crecimiento poblacional promedio ($r \pm DS$) de *B. calyciflorus*, alimentados con *C. vulgaris* cultivada en diferentes concentraciones de N y P. Valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Tratamiento (mg/L)	N	P
Control	$0.40 \pm 0.01a$	$0.40 \pm 0.01a$
1.25	$0.35 \pm 0.005b$	$0.49 \pm 0.005b$
0.625	$0.34 \pm 0.006b$	$0.50 \pm 0.005b$

Tabla 4. Valores de máxima densidad poblacional promedio \pm DS de *B. calyciflorus* alimentado con *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de P y N. *Valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).*

Concentraciones mg/l	Máxima densidad poblacional ind/ml	Día de máxima densidad poblacional
0.625 de P	190 \pm 5a	11
1.25 de P	171 \pm 4c	11
0.625 de N	182 \pm 3b	13
1.25 de N	192 \pm 5a	12
Control (2.5)	171 \pm 4c	13

En la Figura 3, se puede observar la densidad poblacional (ind /ml) de los tratamientos con N, y el grupo control. El crecimiento de *B. calyciflorus* en los tratamientos con disminución de la concentración de N fue un poco mas lento si lo comparamos con el grupo control.

La Figura 4 muestra las curvas de crecimiento poblacional de los tratamientos con concentraciones bajas de P; en ambos tratamientos se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, se puede observar un incremento en la densidad poblacional en el tratamiento con una concentración de 0.625mg/L de P

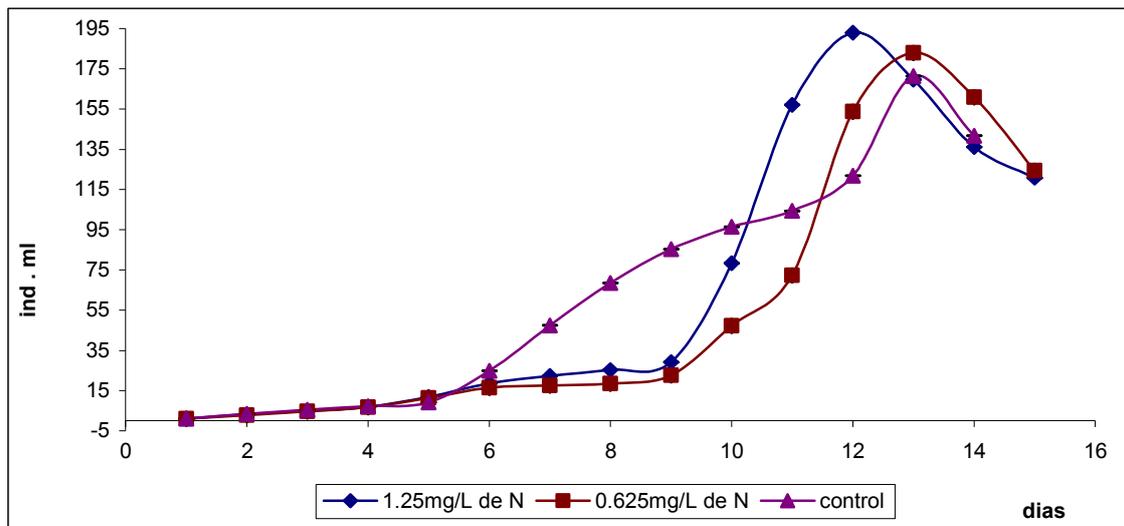


Figura 3. Crecimiento población de *B. calyciflorus* (ind./mL) alimentado con *C. vulgaris* cultivada en diferentes concentraciones N en el medio.

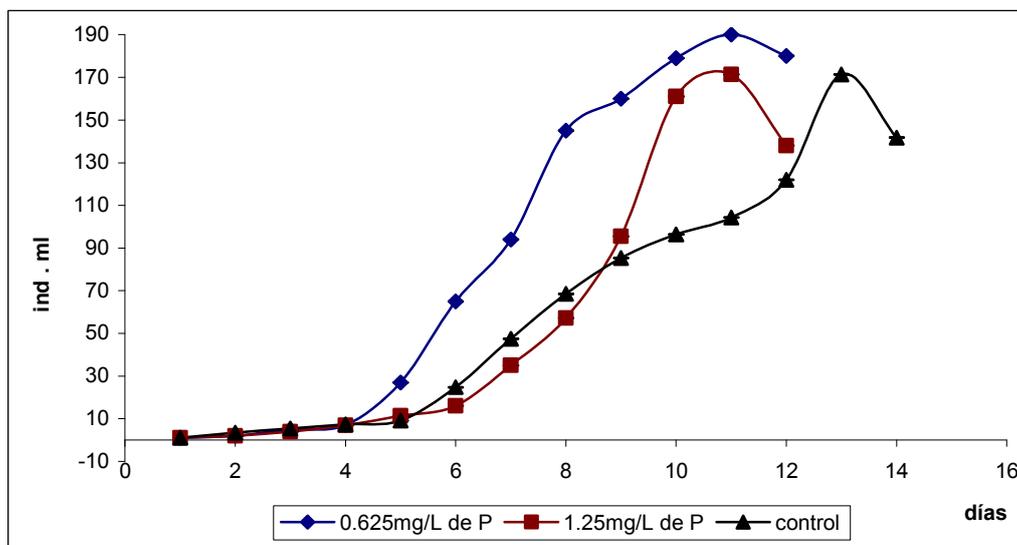


Figura 4. Crecimiento población de *B. calyciflorus* (expresado en ind./mL) alimentado con *C. vulgaris* cultivada en diferentes concentraciones P en el medio.

4. Análisis proximal de *B. calyciflorus*

La tabla 4 muestra la composición bioquímica del rotífero *B. calyciflorus* cultivado en los distintos tratamientos con N y P; al realizar el análisis estadístico Kruskal – Wallis, se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas del tratamiento con 0.625mg/L de N respecto al grupo control; pues esta concentración presenta el contenido proteico más bajo. Los tratamientos con bajas concentraciones de P obtuvieron niveles más bajos en el contenido de proteínas por tanto también existen diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. En el contenido de humedad de igual manera el tratamiento con disminución de P (1.25g/L), mostró diferencias significativas respecto a los demás tratamientos, al mostrar un contenido menor que los demás grupos experimentales. En el contenido de lípidos el tratamiento de 0.625mg/L de N mostró contenido más alto, seguido de 1.25mg/L de N; enseguida los tratamientos con P y el grupo control resultó con los niveles más bajos de lípidos; por lo tanto todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control.

Tabla 4. Valores porcentuales promedio \pm DS de humedad, cenizas, lípidos y proteína de la biomasa de *B. calyciflorus* alimentado con *C. vulgaris* la cual fue cultivada en diferentes concentraciones de N y P. Valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Tratamientos mg/L	Humedad %	Proteínas ¹	Lípidos ¹
1.25 de N	94.33 \pm 0.029a	30.50 \pm 0.73a	17.64 \pm 0.029b
0.625 de N	94.53 \pm 0.161a	20.95 \pm 6.19b	18.52 \pm 0.17b
1.25 de P	91.25 \pm 0.177b	26.30 \pm 2.21c	15.12 \pm 0.031c
0.625 de P	93.51 \pm 0.133a	27.23 \pm 2.21c	14.16 \pm 0.004c
Control (2.5)	94.53 \pm 0.16a	33.022 \pm 0.29a	11.42 \pm 0.030a

¹% En base seca.

DISCUSIÓN

Este estudio nos permitió observar que en concentraciones de 1.25mg/L y 0.625mg/L de P, tuvieron un crecimiento similar al del grupo control, por lo que el P no es un nutriente limitante en el crecimiento poblacional de *C. vulgaris*, aunque ha sido reportado como elemento limitante en el crecimiento poblacional de fitoplancton; ya que es importante en distintos procesos celulares, particularmente en transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos; forma parte de componentes que constituyen los fosfolípidos (Sterner, 1993; Martínez *et al.*, 1997)

El crecimiento poblacional de la microalga *C. vulgaris* fue menor en los cultivos cuando se disminuyó la concentración (1.25mg/L y 0.625mg/L) de N en el medio. La disminución de N mostró un efecto negativo en el crecimiento de la microalga, ya que obtuvo la tasa de crecimiento más baja y por tanto resultó con diferencias estadísticamente significativas. En una población activamente en crecimiento, cuando las células son privadas de N, pueden seguir reproduciéndose favoreciendo la síntesis de carbohidratos y en algunos casos ácidos grasos (Rehab y Diethelm, 2001).

El grupo control de este trabajo mostró un alto contenido de proteína, superior al 50% y es mayor al reportado por Morris (1999), quien obtuvo un valor de 44.56%; pero al ser comparado con nuestros tratamientos (1.25mg y 0.625mg/L) de N y de P, resultaron con un contenido de proteína menor; entre el 34% y 41%; el cual todavía presenta una calidad razonablemente buena. Todos los tratamientos con disminución de N y P, mostraron un contenido de proteína menor al 44.65% obtenido por Janczyk *et*

al., (2007). Cultivos de *Chlorella* en la fase de oscuridad muestran un descenso en la producción de biomasa y en el contenido de carbohidratos mientras que el contenido de proteína se incrementa (Ogbonna y Tanaka, 1996). Habid (1997) reportó un contenido menor de proteína (26.45%), al obtenido en nuestros experimentos y el grupo control de este trabajo. En ambas concentraciones bajas de N el crecimiento fue lento y por debajo del grupo control. En cultivos deficientes de N, la división celular disminuye, probablemente como resultado de agotamiento de nutrientes; la fotosíntesis entonces se dirige hacia productos altamente reducidos, como los ácidos grasos (Piorreck *et al.*, 2002).

En el contenido de lípidos los tratamientos con N a 1.25 y 0.625 mg/L, fue mayor en este trabajo a los reportados por Isik *et al.*, (1999) con la misma microalga ellos encontraron un valor de 17.30% (en base seca) y en este estudio fue de 25.05% y 28.71% respectivamente; la concentración más baja de Nitrógeno aumenta fuertemente el contenido de lípidos de la microalga; la acumulación de lípidos se lleva a cabo en algunas microalgas como una respuesta al agotamiento del suministro de Nitrógeno y pueden proporcionar un enriquecimiento potencial al valor nutritivo de las microalgas (Richardson *et al.*, 1980). El tratamiento de 1.25mg/L de P obtuvo un resultado de 7.1% en el contenido de lípidos y es similar al que obtuvo Habib *et al.*, (1997), podemos mencionar que la disminución de P en un 50% no afecta significativamente el contenido de lípidos, pero si se disminuye un 75% (0.625mg/L) de P el contenido de lípidos es reducido a la mitad 4.6%; por ello lo recomendable sería mantener el P a una

concentración de 1.25mg/L y la calidad de la microalga aun es buena; aunque también podemos realizar la disminución del N, pues resulta ser útil para aumentar el contenido de Lípidos, aunque el crecimiento poblacional lleva de más tiempo.

B. calyciflorus fue alimentado con *C. vulgaris* cultivada en los distintos tratamientos de N y P; los tratamientos con disminución de P alcanzaron su máxima densidad poblacional en un lapso de tiempo de 11 días, mientras que los de N a los 13 días al igual que el grupo control; algunas especies del género *Brachionus* completan su ciclo poblacional en menos de 3 semanas. Cuando se alimentan con alga verde a una temperatura entre 20 – 25° C, *B. calyciflorus* usualmente alcanza su máxima densidad en menos de dos semanas (Alva – Martínez *et al.*, 2007).

La máxima densidad poblacional obtenida en este trabajo fue en los tratamientos de (0.625mg/L) P con 90ind/ml y (1.25mg/L) N con 192ind/ml. El grupo control y el tratamiento con P a una concentración de 1.25mg/L, obtuvieron una máxima densidad poblacional de 171 ind/ml, la cual es semejante a los resultados reportados por otros autores (Snell y Hoff, 1989) quienes obtuvieron valores de 168 individuos/ml.

En este experimento el crecimiento poblacional fue mas favorable para el tratamiento con 0.625mg/L de P, ya que obtuvo la tasa de crecimiento poblacional mas alta (0.5042); la calidad nutricional, así como la digestibilidad almacenada en las microalgas puede variar considerablemente y, en consecuencia, las respuestas en el

crecimiento del zooplancton que se alimentan de ellas (Dobberfuhl y Elser, 1993). Con esto podemos justificar que los dos tratamientos (1.25 y 0.625mg/L) de N que resultaron con las tasas de crecimiento poblacional más bajas, a pesar de que *C. vulgaris* tenía un alto contenido de lípidos y una buena cantidad de proteínas los rotíferos no alcanzaron las tasas poblacionales de los tratamientos con bajas concentraciones de P; el zooplancton herbívoro puede estar limitado por la cantidad y la calidad de sus recursos de alimento, Lampert (1985).

Las tasas de crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* alimentado con *C. vulgaris* cultivada en diferentes concentraciones de Nitrógeno por la autora resultaron de: 0.34 y 0.35, comparadas con los datos de Peredo – Alvarez en el 2003 (0.29) y Sarma *et al.*, en el mismo año (0.25) expresaron valores superiores para k; con respecto a los tratamientos con disminución de Fósforo las tasas de crecimiento poblacional fueron de 0.50 y 0.49; similares a la reportada por Flores – Burgos en el 2003 (0.49).

El crecimiento poblacional de los rotíferos no fue afectado por la disminución de P en el cultivo de la microalga. Aunque se sabe que el P es un limitante en ambientes acuáticos; la calidad alimenticia no es determinada solamente por la composición taxonómica del fitoplancton, sino también por el crecimiento que las condiciona (Smith, 1991), por ejemplo la limitación de N y especialmente la limitación de P se conoce que puede reducir la calidad alimenticia de las algas presentadas como alimento para *Daphnia* (Sterner, 1993); pero también es sabido que las especies del zooplancton

no responden directamente a los niveles de nutrientes en el ambiente sino a los cambios causados por estos en su composición bioquímica y abundancia del fitoplancton (Nandini y Rao, 2000). También se puede sugerir que algunos organismos nacidos dentro de la fase experimental pueden adaptarse a las condiciones a las que se les está exponiendo.

El rotífero *B. calyciflorus* también es un candidato adecuado para la alimentación de larvas de peces de agua dulce con un tamaño adecuado, y una alta tasa de reproducción en el medio de cultivo. Se ha propuesto que con una dieta adecuada, el crecimiento de *B. calyciflorus* podría ser tan alto como el de *B. plicatilis* (Isik *et al.*, 1999). En este trabajo podemos sugerir una dieta para *B. calyciflorus*, disminuir la concentración de P, y así obtener una densidad de 190 ind/ml; lo cual nos permitiría ofrecer una alta densidad poblacional para el siguiente nivel trófico, como pueden ser: bivalvos, crustáceos, larvas de peces. La concentración de alimento afecta la tasa de reproducción y crecimiento, y también el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos (Lubzens *et al.*, 1985).

B. calyciflorus al ser alimentarlo con los tratamientos de *C. vulgaris* a concentraciones de 1.25 y 0.625 mg/L de P mostraron valores bajos en contenido de lípidos (15.12 y 14.16%) comparados con las concentraciones bajas de N fueron (17.64 y 18.52%) superiores a las reportadas (15.59%) por Isik (1999). El grupo control fue el que demostró el menor contenido de lípidos con 11.42%. Se ha reportado de manera

general que los rotíferos contienen un nivel de proteínas entre 28 a 63% y el contenido de lípidos va de un rango de 9 al 20% del peso seco (Lubzens *et al.*, 1985), al comparar estos datos y los obtenidos en este trabajo todos entran en esos rangos. Cerca de 34 - 43% de los lípidos en rotíferos son fosfolípidos y 20 - 55% son triglicéridos. Los fosfolípidos y triglicéridos del rotífero forman parte del perfil de ácidos grasos; ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosapentanoico (DHA) son ácidos grasos esenciales para la supervivencia de larvas de peces marinos, se conocen desde hace varias décadas. En general, los peces contienen grandes cantidades de fosfolípidos: en la membrana celular y ya que no pueden sintetizarlos a ácido linolénico, estos ácidos grasos son esenciales componentes dietéticos. La insuficiencia de ácidos grasos en la dieta de larvas puede resultar en graves consecuencias para una amplia gama de comportamiento fisiológico y procesos metabólicos. La utilización de lípidos depende de la temperatura y regularmente los rotíferos acumulan alrededor de tres a cinco veces más de lípidos totales cuando los cultivos se mantienen a 10 ° C que a 25 ° C; esto sugieren que los niveles más altos de enriquecimiento en el contenido se obtiene a temperaturas relativamente bajas (dependiendo de la cepa de rotífero), donde las tasas de reproducción y los índices de utilización de los mismos es menor o mas lenta (Lubzens y Zmora, 2003).

CONCLUSIONES

- La disminución de N en el medio de cultivo para la microalga limita el crecimiento poblacional en *Chlorella vulgaris*; pero el P no limita el crecimiento poblacional de la misma.
- Al disminuir los elementos (N y P) modificaron la composición bioquímica de la microalga, especialmente en contenido de lípidos y proteínas.
- El P no mostró ningún cambio en el crecimiento poblacional en *Chlorella vulgaris* su composición proximal refleja un aumento en proteínas y lípidos; *Brachionus calyciflorus* al ser alimentado con la microalga cultivada con deficiencia de P obtuvo un mayor crecimiento poblacional pero su composición bioquímica se ve ligeramente modificada con aumento en el contenido de proteína.
- Los tratamientos con N en *Chlorella vulgaris* resultaron con un alto contenido de lípidos, el cual se ve reflejado en el contenido de *Brachionus calyciflorus*, pero el crecimiento poblacional resulta afectado.
- Se puede reducir el P en el medio de cultivo de la microalga y obtener beneficios en el zooplancton, por tanto los tratamientos con bajas concentraciones de P resultan un buen alimento para *Brachionus calyciflorus*.
- Se propone realizar un análisis de aminoácidos y ácidos grasos en la microalga y también en el rotífero (*Brachionus calyciflorus*) después de haber sido alimentado con *Chlorella vulgaris* cultivada en los diferentes tratamientos y concentraciones de N y P.

ANEXOS

Descripción de especies:

Chlorella: (Figura 8) Células verdes aisladas de forma elipsoidales hasta esféricas. De pequeño tamaño (2 – 10 μ m). Reproducción asexual: “autoesporogenesis”. Pared celular delgada sin zonas fragmentadas de celulosa y glucósidos. Principales pigmentos clorofila a, b y carotenos. Sustancias de reserva almidón (Vega, 1996)

Brachionus calyciflorus (Figura 7): son frecuentes y muchas veces abundantes en las aguas dulces y salobres mexicanas. Presentan Mástax maleado. Organismos que presentan lóricas. Regularmente con 4 espinas en el margen anterior de la lórica. Cuerpo saquiforme, de talla 200 – 500 μ m. (Ruttner – Kolisko, 1974)

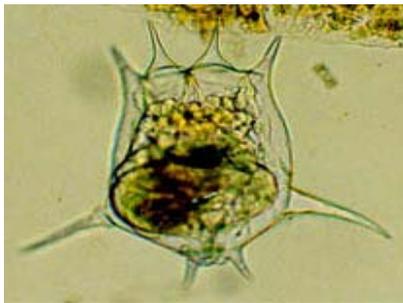


Fig. 7. *Brachionus calyciflorus*

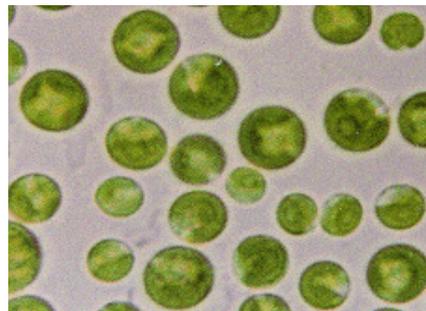


Fig. 8. *Chlorella vulgaris*

MEDIOS DE CULTIVO

Medio Bold

Macronutrientes: Se utiliza el peso indicado de cada compuesto para preparar 1 litro de cada una de las siguientes soluciones (1 - 6).

- 1.- 250 g de Nitrato de Sodio (NaNO_3)
- 2.- 25 g de Cloruro de Calcio (CaCl_2)
- 3.- 75 g de Sulfato de magnesio (MgSO_4)
- 4.- 75 g de Fosfato dibásico de Potasio (K_2HPO_4)
- 5.- 175 g de Fosfato monobásico de Potasio (KH_2PO_4)
- 6.- 25 g de Cloruro de Sodio (NaCl)

Micronutrientes: Disolver cada uno los siguientes reactivos en 1 litro de agua destilada (7 – 10)

- 7.- 50 g de EDTA + 31 g de KOH
- 8.- 4.98 g de FeSO_4 + 1 ml de H_2SO_4
- 9.- 1.42 g de Acido Bórico (H_3BO_3)
- 10.- 8.82 g de Sulfato de Zinc (ZnSO_4), 1.44 g de Cloruro manganoso (MnCl_2); 0.71g de Oxido de Molibdeno (MoO_3); Sulfato de cobre (CuSO_4); Nitrato de Cobalto: $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

De estas diez soluciones, se tomará un 1ml de cada una y se agregará a 1 litro de agua destilada (Borowitzka y Borowitzka, 1988)

Medio EPA

96 mg NaHCO_3 , 60mg CaSO_4 , 60mg MgSO_4 y 4mg KCl por litro de agua destilada (Weber, 1993)

CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA

Centrifugar 10ml de suspensión algal a 3000 rpm por 3 minutos; retirar el sobrenadante. Suspender con 5ml de etanol. Calentar en agua (baño maría) la suspensión por 5 minutos. Llevar cada una de ellas al volumen inicial (10ml). Se midió la absorbancia en un espectro Hach DR 2800, de cada una de ellas en dos longitudes de onda: 665 y 650 nm.

Calcular la cantidad de clorofila por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Clorofila a + b } (4 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650}) \text{ mg / l}$$

(Becker, 1994).

ANÁLISIS PROXIMALES

Contenido de humedad

De acuerdo con AOAC (1990), la muestra cosechada fue colocada en crisoles de porcelana y para su secado se utilizó un horno a $60^{\circ} \text{ C} \pm 2^{\circ} \text{ C}$ por 24 horas. Después de ese tiempo se pesó la muestra y a las dos horas siguientes hasta que las diferencias fueran mínimas.

Contenido de cenizas

Se utilizó muestra seca en crisoles y se colocaron en una mufla a 550° C por 8 horas o hasta que la muestra presente color blanco. La muestra se retiró de la mufla a una temperatura no menor de 100° C y fue pesada (AOAC, 1990)

Lípidos Totales

Utilizando el método Bligh and Dryer (1959), se utilizó una muestra de 0.2 g a la cual se le agregó 1.5ml de cloroformo y 3 ml de metanol fue homogeneizada con un homogenizador por 2 minutos a 15000 rpm. Se agregó 1.5ml de cloroformo y de nuevo se homogeneizó. Se decanto y se separó en un embudo de separación. Se le añadió agua destilada poco a poco (manteniendo siempre la proporción 1:1: 0.8, cloroformo, metanol y agua) se agitó vigorosamente. Al formarse las fases la capa de abajo (capa de cloroformo) fue colectada y evaporada por un rotavapor. Los lípidos totales fueron disueltos en cloroformo: metanol 1:1 y fue secado para después pesarlos.

Contenido de Proteínas - Método de Lowry (Becker, 1994)

Se prepararon tubos con proteína estándar para obtener a una dilución de 400mg/ml. Se agregó un volumen de agua para tener un total de 1.0ml de agua y proteína. Como lo indica la siguiente tabla:

Solución de proteína Estándar (ml)	Agua (ml)	Concentración de proteína (mg/ml)
0.125	0.875	50
0.250	0.750	100
0.500	0.500	200
0.750	0.250	300
1.000	0	400
0.000	1.000	

Estos tubos formaron la curva patrón, se utilizó 0.02g de muestra, se añadió agua destilada a cada tubo con muestra para que esta fuera diluida y llevada a un volumen de 1.0ml

Se agregó 1.0ml de Reactivo de Lowry a los tubos de la curva patrón y a los de las muestras. Se agitó y se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Después del tiempo transcurrido se añadió 0.5ml de Reactivo Folin y Fenol Ciocalteu, a cada tubo. Se dejó por 30 minutos, para el cambio de coloración en cada uno de ellos.

Después se llevó a un volumen de 10ml con agua destilada, para obtener el volumen apropiado para el fotospectrometro de marca Hach DR 2800 y medir con una longitud de onda de 540nm.

Fotos



Fig. 5. Cultivo de *C. vulgaris*



Fig. 6. Cultivo de *B. calyciflorus*



Fig. 9 Análisis de contenido de Lípidos



Fig. 10. Análisis de contenido de Proteínas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlgren G. 1992. Fatty acid content chemical composition of freshwater microalgae. *Journal Phycology* 28: 37- 50.
- Alva – Martínez, A. F., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2007. Population dynamicis *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera) on mixed diets with *Microcystis aeruginosa* and green algae. *Hidrobiologica* 17 (1): 59 – 57.
- Arredondo, J. y A. Flores, 1992. Características Limnológicas de pequeños embalses epicontinentales, su uso y manejo en la acuicultura. *Hidrobiologica* 3 (4): 1 – 10.
- Association Official of Analysis Chemistries. 1990. Official Methods of Analysis. Arlhgton. pp
- Becker, E. W. 1994. Microalgae Biotechnology and microbiology. Cambridge Studies. 58 - 59 pp.
- Bold, C. H. y Wynne, J. M. 1985. Introduction to the Algae: Structure and reproduction. Prentice Hall. 133 – 139 pp.
- Borowitzka, M. A. y L. J. Borowitzka. 1988. Micro – algal biotechnology. Cambridge University, London. 480pp.
- Brown, M. R., 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*.
- Dobberfuhl, D. R. y Elser, J. J. 1993. Use of dried algae as a food source for zooplankton growth and nutrient release experiments. *Journal of Plankton Research* 21: 957 – 970.

- Flores – Burgos, J., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2003. Population Growth of Zooplankton (Rotifers and Cladocerans) Fed *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* in Different Proportions. *Hidrobiologia* 31 (3): 240 – 248.
- Flores – Burgos, J., Sarma, S. S. S. y Nandini, S. 2005. Effect of Single Species or Mixed Algal diets on the Life Table Demography. *Hydrochimical et Hydrobiologica* 33 (6): 614 - 621.
- Franco, T. J. L. 2003. Interacciones competitivas entre rotíferos (*Brachionus angularis*, *B. havanaensis* y *Anuraeopsis fissa*) Herbivoros: la importancia de concentración de alimento y densidad inicial. Tesis Licenciatura. FES – Iztacala. UNAM. México.
- Habid, M. A. B., Yusoff, F. M., Phang, S. M., Ang, K. J. y Mohamed, S. 1997. Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and algal culture. *Aquaculture* 158: 95 – 105.
- Isik, O., Sarihan, E., E. Kusvuran.; Ö., Gül. y Erbatur., O. 1999. Comparison of the fatty acid composition of the freshwater fish larvae *Tilapia zillii*, the rotifer *B. calyciflorus*, and the microalgae *Scenedesmus abundans*, *Monoraphidium minutum* and *Chlorella vulgaris* in the algae – rotifer – fish larvae food chains. *Aquaculture* 174: 299 – 311.
- Janczyk, P., Franke, H. y Souffrant, W. B. 2007. Nutritional value of *Chlorella*. *Animal Feed Science and Technology* 132: 163 – 169.
- Jeanfils, J., Canisius, M. y Burlion, N. 1993. Effect on high nitrate concentration on growth and nitrate uptake by freeliving and immobilized *Chorella vulgaris* cells. *Journal Applied Phycology* 5: 369 - 374.

- Kennari, A. A., Ahmadifard, N., Seyfabadi, J. y Kapourchali, M. F. 2008. Comparison Growth and Fatty Acids Composition of Freshwater Rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas, Fed with Two Types of Microalgae at Different Concentrations. *Journal of the World Aquaculture Society* 39 (2): 235 – 242.
- Lampert, W. 1985. Food limitation and the structure of zooplankton communities. *Limnology and Oceanography* 21: 285 – 298.
- Lubzens, E., Marko, A. y Teitz, A. 1985. De novo síntesis of fatty acid in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 47: 27 – 37.
- Lubzens, E. y Zmora, O. 2003. Production and Nutricional Value of Rotifers. En: Live Feeds in Marine Aquaculture. Stottrup, G. J. y Mc Evoy, A. L. Blackwell. 45 – 49 pp.
- Margalef, R., 1983. Limnología. Ed Omega. España. 957, 1010 pp.
- Martínez, S. Ma. E., Jiménez, C. J. M. y Farida, E. Y. 1997. Influence of Phosphorous concentration on the Growth Kinetics and Stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biochemistry* 32 (8) : 657 – 664.
- Moronta, R., Mora, R. y Morales. E. 2006. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía* 23 (1): 28 – 43.
- Morris, Q. H. J., Quintana, C. M. M., Almarales, A. A., y Hernández, N. L. 1999. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 13(2): 123 – 128.

- Muller – Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology* 12: 527 – 534.
- Nandini, S. y Rao, R. 2000. Microcosm Experiments on the effect of Nutrient Enrichment. *Limnologica Ecology and Management of Inland Waters* 30(1): 9 – 19.
- Nianjun Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L. y Zeng, Ch. 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion sp.* *Journal of Applied Phycology* 13: 463 – 469.
- Nogrady, T., Wallace, R. L. y Snell, T. W. 1993. Rotifera. Vol. 1. Biology, ecology and systematics. SBP Academic Pub., The Hague. 142 pp
- Ogbonna, C. J. y Tanaka, H. 1996. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* . *Journal of fermentation and bioengineering* 82 (6): 558 – 564.
- Pavón – Meza E. L., S. S. S. Sarma y Nandini. S. 2007. Combined effects of temperature, food (*C. vulgaris*) concentration and predation (*Asplanchna girodi*) on the morphology of *B. havanaensis* (Rotifera). *Hydrobiologia* 593: 95-101.
- Peredo – Álvarez, V. M., Sarma, S. S. S y Nandini, S. 2003. Combined Effect of Concentrations of Algal Food (*Chlorella vulgaris*) and Salt (Sodium Chloride) on the Population Growth of *B. Calyciflorus* and *B. Patulus* (Rotifera). *Revista Biología Tropical* 51(2): 399 – 408.

- Piorreck, M., Klaus – Hinnerk, B. y Pohl. P. 2002. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23(2):207 – 216.
- Rehab, M. S. y Diethelm. K. 2001. Effect of Nitrogen Limitation on Photosynthesis and Pigment Patterns. *Biomass* 9: 220 – 227.
- Reynolds, S. C. 1984. The Ecology of freshwater: Phytoplankton. Cambridge. Gran Bretaña.
- Richardson, B., Orcutt, D. M., Schwertner, H. A., Martinez, C. L. y Wickline, H. E. 1980. Effects of Nitrogen Limitation on The Growth and Composition of Unicellular Algae in Continuous Culture. *Applied Microbiology* 18 (2): 245 – 250.
- Rioboo, C., O. González., A. C. y Herrero. C. 2003. Análisis del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en cultivos expuestos al herbicida isoproturon. *Aquatic Toxicology* 59: 225 – 235.
- Roessler, P. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: comercial implications and future research directions. *Journal of Phycology* 26: 393 – 399.
- Ruttner – Kolisco, A. 1974. Plankton Rotifers: Biology and Taxonomy. Stuttgart. 59 – 64 pp.
- Sarma, S. S. S. 1991. Rotifers and Aquaculture. *Environment and Ecology* 9(2): 414 – 428.
- Sarma, S. S. S., Larios, J. P. S. y Nandini, S. 2001. Effect of three food types on the population Growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae) *Revista Biología Tropical* 49 (1): 77 – 84.

- Sarma, S. S. S., Trujillo, H. E. y Nandini, S. 2003. Population Growth of Herbivorous Rotifers and Their Predator (*Asplanchna*) on Urban wastewaters. *Aquatic Ecology* 37: 243 – 250.
- Serranía, S.C.R. 1996. Diversidad de Rotíferos Monogonontos en algunos sistemas acuáticos del Estado de México. Tesis Licenciatura. FES – Iztacala. UNAM. México.
- Sládeček, V. 1983. Rotifers as indicators of water quality. *Hidrobiología* 100: 169 – 201.
- Smith, V. H. 1991. Competition between consumers. *Limnology and Oceanography* 36: 820 – 823.
- Snell, T. W. y Hoff. F. 1989. A new live food for tropical fish. Final Report to Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Florida. *Aquaculture Market Development Aid Program* 174 (3): 299 – 311.
- Suchar, V. A. y Chigbu, P. 2006. The Effect of Algae Species and Density on the Population Growth of the Marine rotifer, *Colurella dicentra*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 337: 96 -102.
- Sterner, R. W. 1993. *Daphnia* growth on varying quality of *Scenedesmus*: Mineral limitation of zooplankton. *Ecology* 74: 2351 – 2360.
- Thorp, J., H y Covich A., P. 1991. Ecology and classification of North American Freshwater invertebrates. Academic – Press, Inc. E. U. A.
- Vega, S. 1996. Caracterización y análisis bromatológico de una cepa monoalgal: *Chlorella vulgaris* Beijerinck colectada de la atmósfera con posible uso en Acuicultura. Tesis. UNAM. Campus Iztacala. México. 46 – 50 pp.

- Weber, C. I. 1993. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 4^a. Environmental Protection Agency. Ohio. USA.
- Wetzel, G. R. 1981. Limnología. Omega. Barcelona.