

## Comparación de la densidad poblacional de *Daphnia pulex* Müller, 1785 en cultivos de laboratorio alimentadas con tres microalgas verdes unicelulares (*Sphaerocystis* sp., *Chlorella vulgaris* y *Haematococcus pluvialis*).

Alcántara-Azuara AK, Contreras-Rodríguez AI, Reyes-Arroyo NE, Castro-Mejía J\*, Castañeda-Trinidad H, Castro Mejía G. y Ocampo-Cervantes JA.

Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento El Hombre y su Ambiente. Calz. del Hueso No.1100. Col. Villa Quietud. México. CP.04960. D.F. Delegación Coyoacán. Tel. (5255)54837151.

\*Email: [camj7509@correo.xoc.uam.mx](mailto:camj7509@correo.xoc.uam.mx)

### RESUMEN

Esta investigación se centró en determinar la densidad poblacional de *D. pulex* alimentadas con tres microalgas: *C. vulgaris*, *H. pluvialis* y *Sphaerocystis* sp. (600 mL a una concentración de  $5 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>). La cuarta dieta fue una combinación a partes iguales de las tres microalgas. Además de las microalgas, cada tercer día, se les suministró 2 mL de levadura (100 g en 4 L de agua). Para el cultivo se utilizaron recipientes de 20 L de capacidad con 10 L de agua (tres por dieta). La temperatura se mantuvo en  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , el pH 7-8, así como la luz y aireación constantes. La densidad inicial fue de 2000 organismos. Cada tercer día, se tomó una muestra de 500 mL, de la cual se tomaron 10 submuestras de 5 mL para obtener un promedio ( $\pm$ D.S). Con los datos obtenidos se determinó la curva de tendencia de crecimiento de los organismos con cada dieta experimental. La fórmula de crecimiento fue una polinomial grado seis. Los resultados muestran que es a partir del día 12 de cultivo cuando, la densidad de organismos aumenta en todas las dietas, siendo la dieta con *H. pluvialis*, la que alcanzó mayor densidad ( $19,331 \pm 60$  org 10 L<sup>-1</sup>) y la dieta con menor densidad fue con *C. vulgaris* ( $9,762 \pm 89$  org 10 L<sup>-1</sup>). Aunque las dietas con *C. vulgaris* y la combinada no dieron valores altos, la producción es más constante a lo largo de los días de cultivo. Las microalgas empleadas en este experimento proporcionaron información relevante sobre la producción masiva de este crustáceo, esto permite obtener y escalar los sistemas de cultivo para producir densidades suficientes de *D. pulex* destinadas para la alimentación de especies acuáticas de importancia comercial y de investigación.

**Palabras Clave:** *Daphnia pulex*, microalgas verdes, densidad de organismos, curvas de tendencia.

### INTRODUCCIÓN

El alimento vivo en acuicultura juega un papel importante dentro del desarrollo óptimo de los organismos acuáticos, ya que se ha observado muchas veces que el alimento inerte, ya sea en hojuelas o “pellets” es rechazado fácilmente (Romero-Gamboa 2002). Además, puede llegar a ser de fácil producción, se distribuye mejor en el contenedor de cultivo sin que deteriore el medio, es de mejor contenido nutricional, puede encontrarse en diferentes tamaños si el organismo que se produce tiene diferentes estadios, tiene mejor digestibilidad y por lo tanto de una mayor limpieza en el lugar de cultivo, pues estos alimentos no son disueltos en el agua como el alimento convencional y no llegan a descomponerse contaminando el agua de cultivo (Luna 2013). El suministro de alimento vivo da mejores resultados en las primeras etapas de vida de peces y crustáceos (alevines y larvas), que son las más problemáticas antes de pasar a alimentación de tipo inerte, dando como consecuencia mayores niveles de supervivencia, desarrollo y madurez sexual de los organismos en cultivo (Ocampo et al. 2010).

Resulta común que especies zooplanctónicas como ciliados: rotíferos y paramecios; insectos: larvas de tenebrios; crustáceos: copépodos, ostrácodos y *Artemia*, sean utilizados como alimento vivo en acuicultura por su facilidad de crianza y la capacidad de modificar sus valores nutricionales, ya sea debido a que son organismos filtradores o por el alimento consumido (Castro et al. 2003). Dentro de los crustáceos se encuentran dos géneros de agua dulce de gran

Densidad poblacional de *Daphnia pulex*

Alcántara-Azuara AK, Contreras-Rodríguez AI, Reyes-Arroyo NE, Castro-Mejía J, Castañeda-Trinidad H, Castro Mejía G. y Ocampo-Cervantes JA.

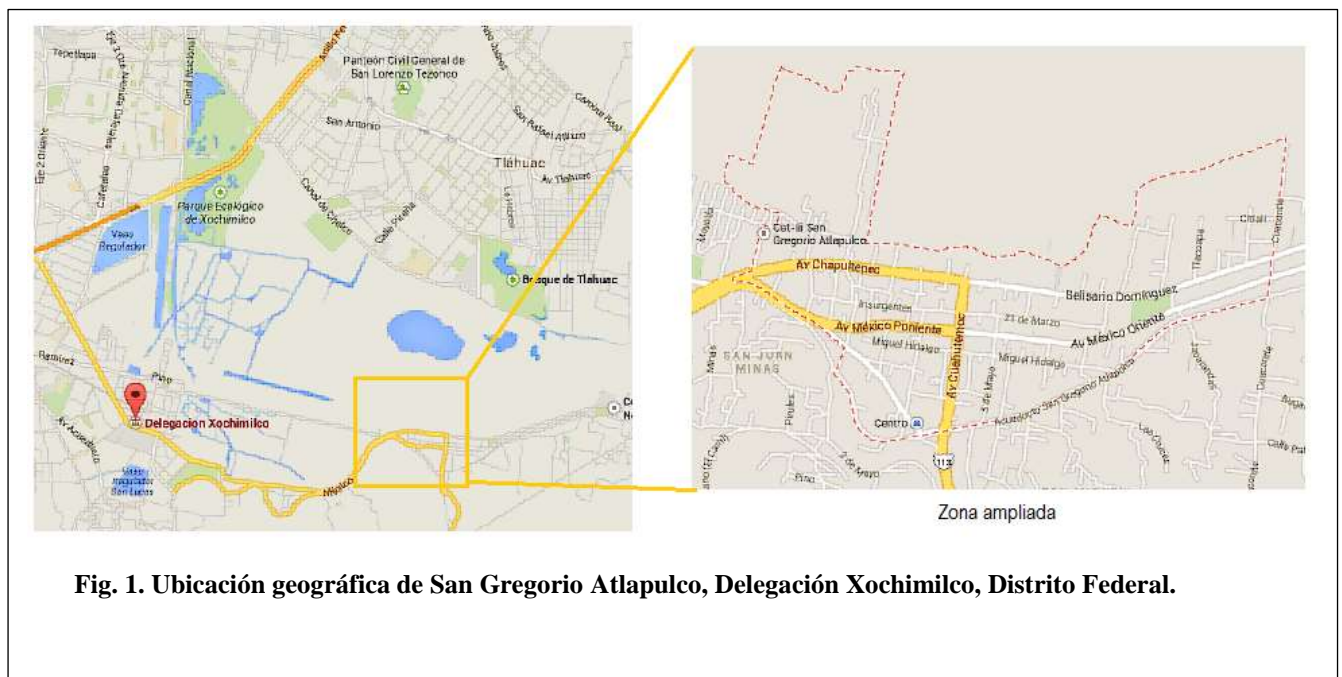
importancia que son *Daphnia* sp. y *Moina* sp. El género *Daphnia* se compone de aproximadamente 100 especies de las cuales las más conocidas son: *D. magna*, *D. pulex*, *D. longispina*. Este género se conforma de crustáceos planctónicos que se alimentan de partículas suspendidas en el agua por lo que se consideran filtro alimentadores (Ocampo et al. 2010). *D. pulex* se desarrolla en temperaturas de 27-28°C y no sobrevive a cambios extremos de temperatura. Estos organismos habitan en medios donde la concentración de O<sub>2</sub> es variable ya que pueden crecer tanto en completa saturación hasta concentraciones por debajo de 2 mg L<sup>-1</sup>. Es abundante en ambientes con alta concentración de materia orgánica en donde proliferan bacterias, levaduras y microalgas de las cuales se alimenta (Torretera y Tacon 1989). Soporta rangos muy bajos de metales pesados así como desechos industriales que resultan mortales (Martínez et al. 2010).

Por lo antes mencionado la producción de *D. pulex* en condiciones de laboratorio puede ser relativamente sencilla, ya que las condiciones ambientales pueden controlarse y debido a la posibilidad de suministrar diversas dietas que se

pueden usar como alimento. No obstante, los mejores resultados se han observado cuando se utilizan microalgas verdes unicelulares, de preferencia *Chlorella vulgaris*. En este estudio, la utilización de ésta y otras dos microalgas (*Haematococcus pluvialis* y *Sphaerocystis* sp.) además de una dieta con la combinación de las tres, permitirá obtener información para abrir el abanico de posibilidades de alimento en los diferentes laboratorios donde se quiera implementar el cultivo de este pequeño crustáceo filtrador y obtener densidades poblacionales adecuadas para su producción masiva.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Obtención de organismos.** Los organismos de *D. pulex* utilizados en el experimento se obtuvieron de la localidad de San Gregorio Atlapulco, Xochimilco (Fig.1). Los cuales fueron colocados en un cilindro de plástico de 200 L de capacidad con 160 L de agua dulce y alimentados con microalgas verdes unicelulares durante una semana para su aclimatación.



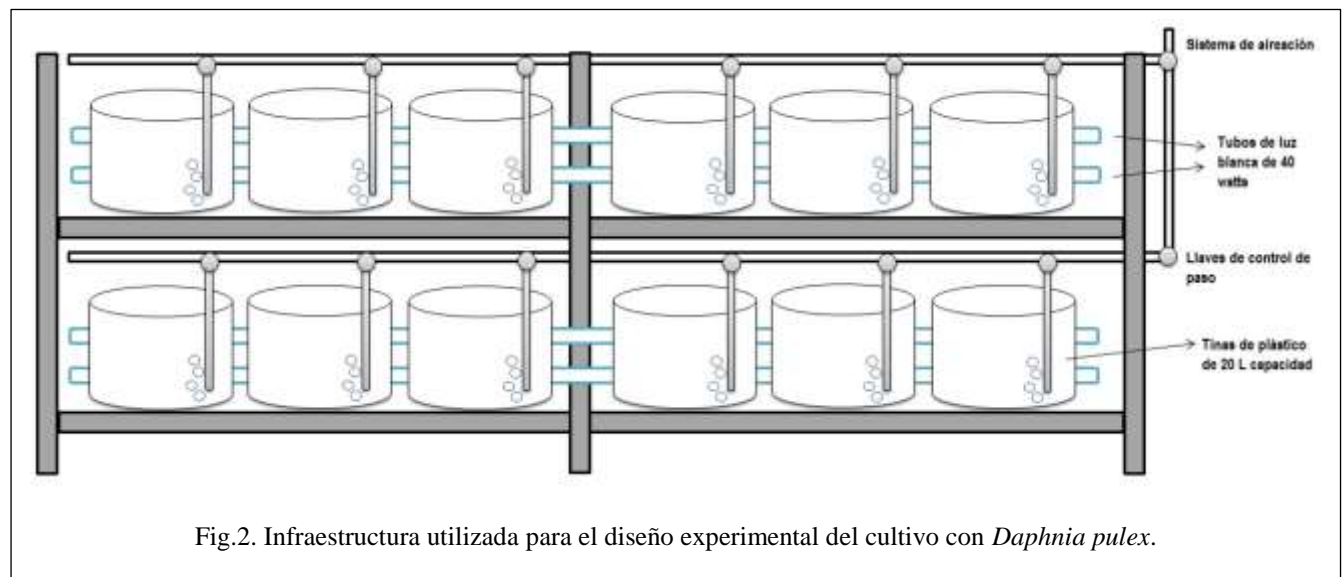
**Fig. 1. Ubicación geográfica de San Gregorio Atlapulco, Delegación Xochimilco, Distrito Federal.**

**Cultivo de microalgas.** Las microalgas fueron producidas en garrafones de 20 L, con 19 L de agua dulce filtrada, desionizada y de clorada. Fueron fertilizadas con 10 mL de Triple 17 (500 g 500 mL<sup>-1</sup> de agua) y 5 mL de Urea foliar (1 Kg 4 L<sup>-1</sup> de agua). Cada semana, los garrafones fueron desdoblados a la mitad para mantener la concentración deseada de 500 x10<sup>3</sup> células mL<sup>-1</sup>.

**Diseño experimental.** Se procedió a instalar una serie de recipientes de plástico de capacidad de 20 L (triplicado por cada dieta). La temperatura ambiental se controló a 25±2°C, un pH del medio de cultivo entre 7-8, y luz y aireación continua (Fig.2).

contados para determinar la densidad poblacional. Para ello, se tomaron 500 mL de muestra de cada garrafón y de este, 10 submuestras de 5 mL para poder sacar un promedio (±D.S.). Los valores fueron colocados en una base de datos en Excel 2010 para obtener una estadística descriptiva tanto por dieta como por muestreo.

Los datos fueron procesados estadísticamente con la ayuda del paquete Systat 13, para determinar diferencias significativas (P<0.05) por medio de un análisis de varianza (ANDEVA) de una sola vía. Además por medio del Excel 2010, se obtuvieron las curvas de tendencia de crecimiento de la densidad poblacional.



La población de *D. pulex* aclimatada se concentró en seis litros de agua, de los cuales se tomaron 500 mL para la inoculación de cada garrafón de 20 L de capacidad con 10 L de agua. A cada serie de tres garrafones, se le suministraron 600 mL de dieta con: 1) *C. vulgaris*; 2) *H. pluvialis*; 3) *Sphaerocystis* sp. y 4) combinada (las tres microalgas en partes iguales, 200 mL). Además de alimentar a los cultivos con microalgas cada tercer día, se suministraron 2 mL de levadura activa seca (100 g 4 L<sup>-1</sup> de agua) como complemento alimenticio.

**Toma de muestras y procesamiento de datos.** Cada tercer día, los organismos fueron

## RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los datos promedio (±D.S.) de la densidad poblacional de *D. pulex* en los cultivos con las cuatro dietas experimentales por día de cultivo. En esta tabla se observa que las mayores densidades fueron con la dieta de *H. pluvialis* con valores de hasta 19,000 org 10 L<sup>-1</sup>. Las dietas de *Sphaerocystis* sp. y Combinada alcanzaron densidades de 12,000 a 13,000 org 10 L<sup>-1</sup>, mientras que la menor densidad se observó con la dieta de *C. vulgaris* obteniendo de 9,000 a 11,000 org 10 L<sup>-1</sup>.

El análisis de varianza tanto de los muestreos de cada dieta y los muestreos entre todas las dietas, presentaron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ). Sólo en el caso de la dieta con *C. vulgaris*, la densidad de organismos no fue significativa entre el día inicial y el sexto ( $P = 1.000$ ), así como los valores entre los días 18 y 30 de cultivo ( $P = 1.000$ ) (Fig. 3).

Las curvas de tendencia de crecimiento de la densidad poblacional de los cultivos de *D. pulex* alimentados con las cuatro dietas experimentales se presentan en la Fig.4. Las curvas de tendencia en todas las dietas mostraron una curva polinómica de grado seis.

## DISCUSIÓN

En el cultivo de *D. pulex* a nivel de laboratorio se han utilizado una gran variedad de dietas vivas, dietas inertes o combinación de las mismas, las cuales arrojan información diferente acerca de la densidad de organismos que se obtiene. En este experimento no se pretendió mencionar cuál dieta es buena o mala, sino dar la información necesaria para que los productores acuícolas que necesitan este alimento vivo puedan tomar una decisión acerca de la microalga a utilizar, así como la incorporación de un alimento inerte, en este caso la levadura seca activa, o realizar una combinación de dos o tres microalgas y complementarla con levadura preparada.

Como se mencionó anteriormente, hay trabajos realizados con esta especie de cladóceros (*D. pulex*) donde han obtenido diferentes resultados. Rojas et al. (1999), trabajaron con *D. pulex* en 14 L de cultivo, a 22°C utilizando tres dietas a base de salvado de trigo: a) salvado solo (10 mL), b) salvado+jugo de rábano y c) salvado+jugo de espinaca. Ambos en relación 1:50, suministrados dos veces por semana. Los cultivos comenzaron con una densidad inicial de 200 org 14 L<sup>-1</sup> y tuvieron una duración de cultivo de 21 días. Los resultados de densidad fueron 1,722; 7,997 y 8,921 org 14 L<sup>-1</sup> respectivamente. La densidad se incrementó en un 400-500% cuando al alimento inerte se le agregaron

los jugos vegetales. Aun así, los valores de densidad están por debajo de los obtenidos en este experimento con microalgas a una concentración de 5 x 10<sup>6</sup> cél mL<sup>-1</sup> en recipientes de 10 L, los cuales se encuentran entre 600-700% arriba.

**Tabla 1. Valores promedio (±D.S.) de la densidad de organismos por dieta experimental y día de muestreo.**

Días de cultivo	Dietas experimentales			
	<i>Sphaerocystis</i> sp.	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Combinada
0	2,000	2,000	2,000	2,000
	±25	±25	±41	±55
3	3,329	1,673	1,820	1,918
	±22	±22	±42	±54
6	2,755	2,018	1,640	1,835
	±31	±44	±44	±42
9	2,213	3,201	4,609	4,030
	±48	±22	±50	±46
12	6,688	6,141	7,272	2,409
	±73	±23	±56	±53
15	11,786	8,821	9,756	8,099
	±82	±98	±46	±36
18	12,490	9,742	12,676	13,070
	±80	±99	±69	±30
21	9,139	9,377	16,163	11,837
	±68	±101	±49	±39
24	7,298	9,640	19,211	8,903
	±42	±97	±48	±38
27	11,538	11,358	19,331	11,943
	±37	±142	±60	±50
30	13,095	9,762	12,517	10,733
	±24	±89	±69	±58

Densidad poblacional de *Daphnia pulex*

Alcántara-Azuara AK, Contreras-Rodríguez AI, Reyes-Arroyo NE, Castro-Mejía J, Castañeda-Trinidad H, Castro Mejía G. y Ocampo-Cervantes JA.



Alva-Martínez et al. (2001), trabajaron con *D. pulex* y *Moina macrocopa*, alimentadas con *C. vulgaris* a tres concentraciones diferentes ( $0.75$ ,  $1.5$  y  $3.0 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>), obtuvieron valores de densidad de 3, 4 y 6 org mL<sup>-1</sup> respectivamente; estos valores son más altos a los encontrados en esta investigación con *C. vulgaris*, dando una diferencia promedio de 28,642 org en 10 L<sup>-1</sup> de cultivo con la misma microalga. El mismo incremento se observa con *M. macrocopa*, en donde la densidad promedio alcanza los  $50 \times 10^3$  org 10 L<sup>-1</sup>, también alimentados con *C. vulgaris*. Mangas-Ramírez et al. (2001), obtuvieron densidades de *D. pulex* alimentadas con *C. vulgaris* a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> de 2 org mL<sup>-1</sup>, mientras que en este experimento fue de 1 org mL<sup>-1</sup> con esta misma microalga; esta densidad es semejante pero con la microalga *H. pluviialis*.

Sánchez-Ortiz et al. (2010), trabajaron con *Ceriodaphnia dubia* y *D. pulex* alimentadas con *Scenedesmus acutus* y obtuvieron densidades de 2 org mL<sup>-1</sup> con *D. pulex*, valor semejante a lo encontrado con *H. pluviialis* en este experimento. Estos autores mencionan que la densidad alcanzada por este crustáceo depende de la temperatura, concentración de alimento, así como del tamaño del cuerpo. Cuando las dos primeras variables son controladas de forma adecuada, la variación de la densidad puede estar dada solamente por el tamaño de los organismos, siendo que especies de mayor tamaño obtienen densidades más bajas que las especies de menor tamaño. En el caso del trabajo de Sánchez-Ortiz et al. (2010), *C. dubia* obtuvo una densidad de 5 org mL<sup>-1</sup>, tres organismos más que los obtenidos en *D. pulex*. Nandini y Sarma (2003), mencionan que mientras más grande es el

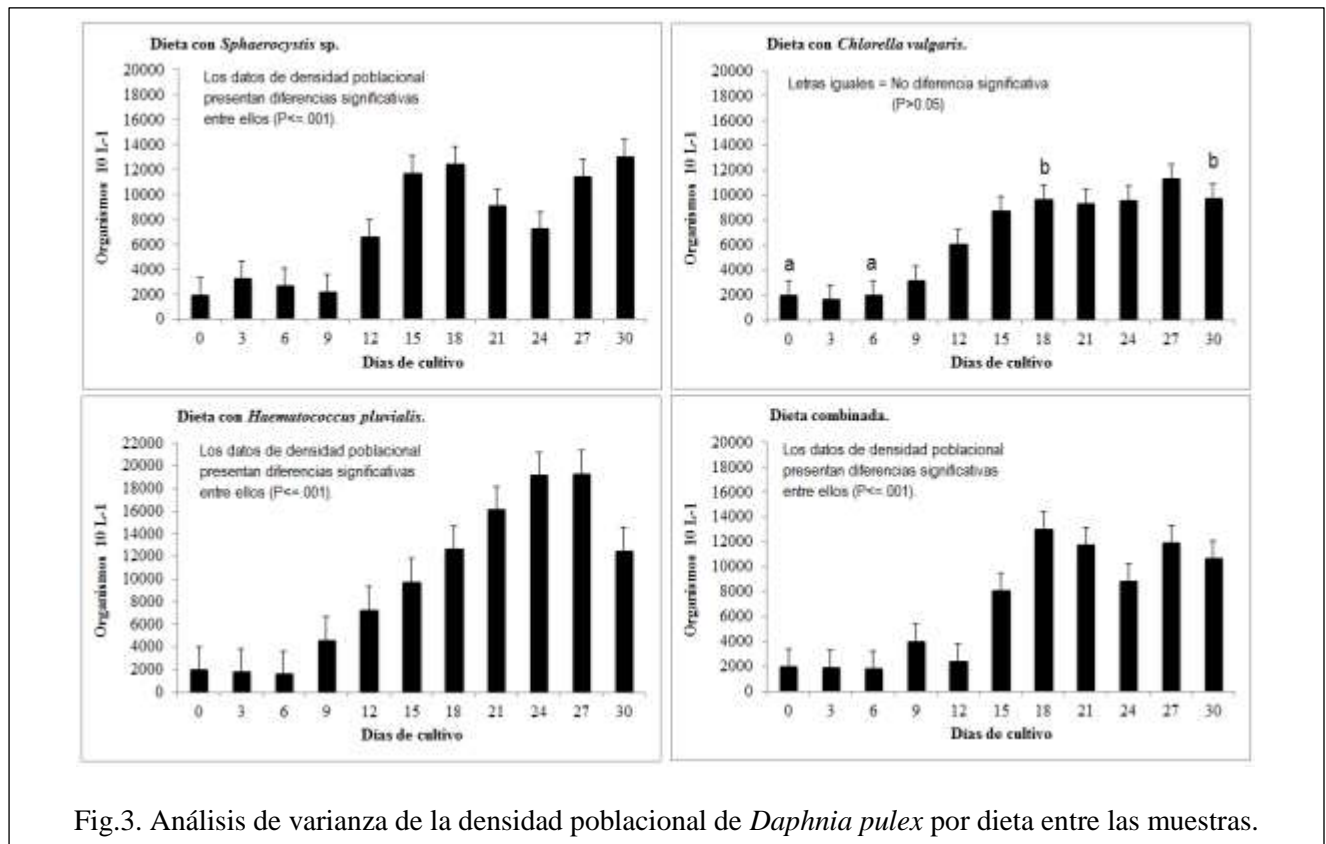


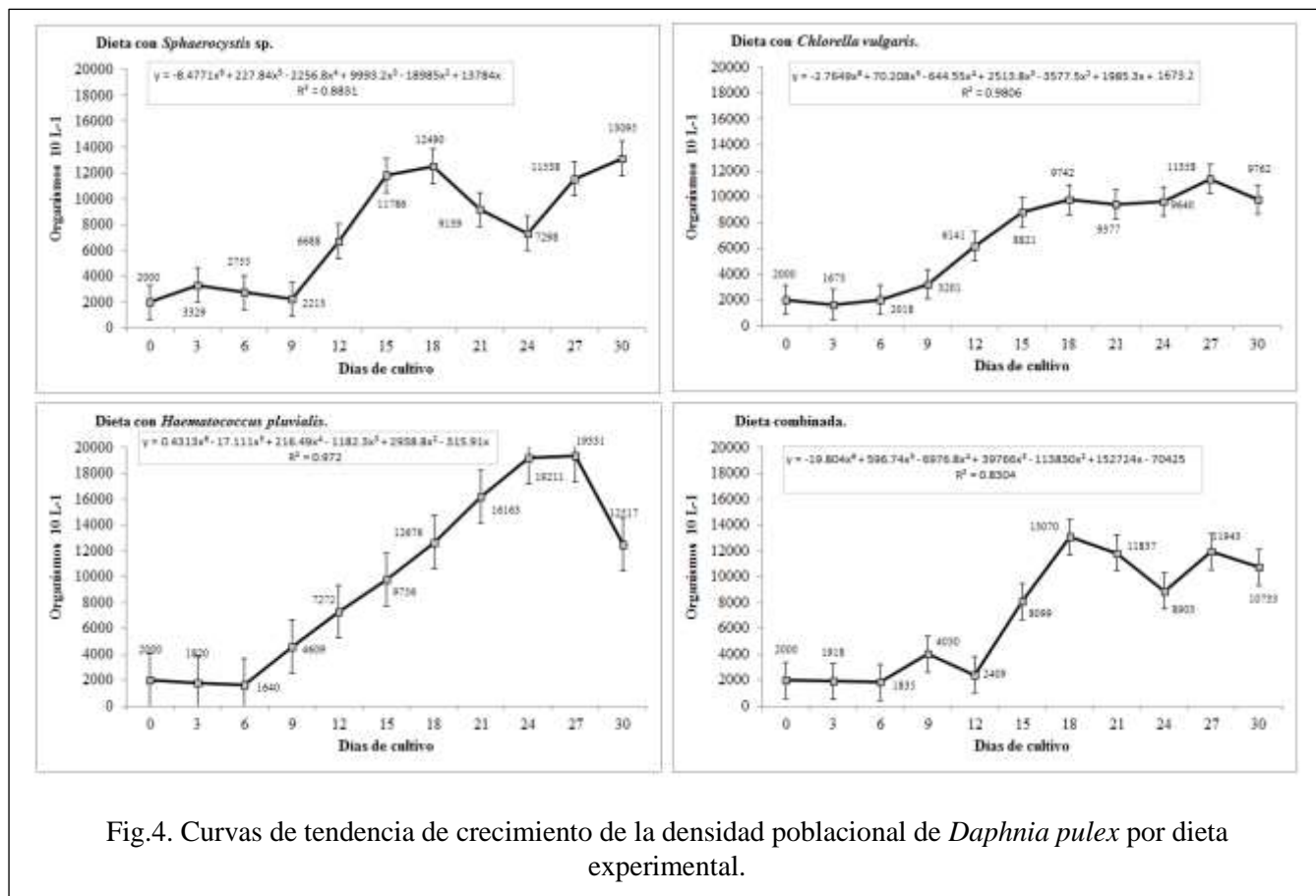
Fig.3. Análisis de varianza de la densidad poblacional de *Daphnia pulex* por dieta entre las muestras.

organismo cladóceros en cultivo, la concentración de alimento debe disminuirse debido a la baja tasa de producción que presentan los individuos, que aquellos con talla pequeña, cuya producción se incrementa más rápidamente debido a que alcanzan la madurez sexual más rápido que los cladóceros con talla mayor y por lo tanto contribuyen al incremento de la densidad de los cultivos (Alva-Martínez et al. 2007). Esto mismo mencionan Feniova et al. (2013), que reportan que *D. pulex* (considerada como cladóceros grande por tener una talla de  $1.6 \pm 0.06$  mm), su densidad declina más rápidamente a los 27°C que cuando se encuentra a 20°C.

Gama-Flores et al. (2011), trabajaron con *D. pulex* y *C. dubia* utilizando como alimento *C. vulgaris* ( $0.01$ ,  $0.1$  y  $1.0 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>); y con tres temperaturas diferentes (15, 20 y 25°C). *D. pulex*

tuvo una mayor densidad a una concentración de alimento de  $1.0 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> y a 20°C con valores de 50 org 40 mL<sup>-1</sup>, 10 organismos más que los encontrados en este trabajo con *C. vulgaris*, pero 50% menos que con la microalga *H. pluvialis*, que presenta 80 org 40 mL<sup>-1</sup> de cultivo. Estos autores mencionan que la densidad no sólo puede cambiar por la concentración del alimento suministrado, sino también a una temperatura específica por lo que son dos variables a considerar en el cultivo de este cladóceros.

No siempre el incremento en la concentración de la microalga, garantiza el incremento en las poblaciones de cladóceros, debido a que este aumento puede provocar pérdida en la capacidad de fecundidad de las hembras presentes en el cultivo por competencia por el espacio (Kilham et al. 1997; De Mott et al. 1998; Jong et al.



2014). Muñoz y Martínez (2007), indican que hay que considerar la presencia del número de hembras adecuadas al inicio del cultivo para que estas tengan la posibilidad de presentar mejores tasas de fertilidad y permitir un mayor incremento en la densidad del cultivo desde el inicio del experimento y no tener que esperar a que se produzcan hembras y crezcan hasta llegar a la diferenciación sexual para poder reproducirse.

Es importante considerar en este tipo de cultivos con cladóceros, la composición de la pared celular de las microalgas, debido a que los organismos pueden reducir su capacidad digestiva de la misma y por consiguiente presentar una absorción de nutrientes más lenta, alargando así el tiempo de la fertilidad de la población y su regeneración como lo mencionan Van Donk y Kilham (1990).

Por último, es importante destacar lo que mencionan Jong et al. (2004), en donde los cultivos con cladóceros se ven mejorados en su producción, cuando la microalga que se utiliza es una diatomea, las cuales mejoran la capacidad digestiva de *D. pulex*, además de que su contenido nutricional es superior en cuanto a lípidos y carbohidratos con respecto a las microalgas verdes unicelulares. La calidad nutricional de las diatomeas incrementa la tasa de reproducción de las hembras de *Daphnia pulex*, así como un crecimiento más rápido para poder llegar a la madurez sexual y comenzar a reproducirse para regenerar la población en los medios de cultivo.

## CONCLUSIONES

La dieta con la microalga *H. pluvialis* presentó los valores más altos de densidad de *D. pulex* en el experimento, siendo la diferencia con respecto a las otras dietas casi del 50%. En promedio, la densidad obtenida en los cultivos fue de 1 org mL<sup>-1</sup> y para *H. pluvialis* de 2 org mL<sup>-1</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

Alva-Martínez AF, Sarma SSS, Nandini S. (2001). Comparative Population Dynamics of Three Species of Cladocera in Relation to Different

- Levels of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana* 74(8): 749-764.
- Alva-Martínez AF, Sarma SSS, Nandini S. (2007). Effect of mixed diets (cyanobacteria and green algae) on the population growth of the cladocerans *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa*. *Aquat. Ecol.* 41:579-585.
- Castro BT, De Lara AR, Castro MG, Castro MJ, Malpica SA. (2003). Alimento vivo en la acuicultura. *Contactos* 48: 27-33.
- De Mott WR, Gulati RD, Siewertsen K. (1998). Effects of phosphorus-deficient diets on the carbon and phosphorus balance of *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography* 43(6):1147-1161.
- Feniova IY, Palash AL, Razlutskiy VI, Dzialowski AR. (2013). Effects of temperature and resource abundance on small- and large-bodied cladocerans: Community stability and species replacement. *Open Journal of Ecology* 3(2): 164-171.
- Gama-Flores JL, Huidobro-Salas ME, Sarma SSS, Nandini S. (2011). Somatic and population growth responses of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) to changes in food (*Chlorella vulgaris*) level and temperature. *J. Environ. Biol.* 32: 489-495.
- Jong YCh, Seong KK, Kwang HCH, Myoung CHK, Geung HL, Gea JJ, Wang SJ. (2004). Population Growth of the Cladoceran *Daphnia magna*. A Quantitative Analysis of the Effects of Different Algal Food. *Plos One* 9(4):1-8.
- Kilham SS, Kreeger PA, Goulden CE, Lynn S. (1997). Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. *Freshwater Biology.* 38: 639-647.
- Luna-Figueroa J. (2013). Alimento vivo en la dieta de peces (una alternativa nutritiva). *Ciencia y Desarrollo.* Disponible en: <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/265/articulos/alimento-vivo-en-dieta-peces.html>
- Mangas-Ramírez E, Sarma SSS, Nandini S. (2001). Acute and Chronic Toxicity of Ammonium Chloride to the Cladoceran *Daphnia pulex* Leydig in Relation to Algal Food Density. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 834-840.
- Martínez S, Vela A, Botero, F Arandia. y P Mollinedo. (2010). Nuevo micro-bioensayo de ecotoxicidad de extractos acuosos de plantas medicinales sobre *Daphnia magna* sp., *Revista Boliviana de Química*, 27(1):29-32.
- Muñoz MG y JF Martínez. (2007). Impact of algae and their concentrations on the reproduction and

- longevity of cladocerans. *International Journal of Limnology*, 43(3):167-177.
- Nandini S, Sarma SSS (2003). Population growth of some genera of cladocerans (Cladocera) in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Hydrobiologia*, 491: 211–219.
- Ocampo LE, Botero MC, Restrepo LF. 2010. Evaluación del crecimiento de un cultivo de *Daphnia magna* alimentado con *Saccharomyces cerevisiae* y un enriquecimiento con avena soya. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(1), 78-85.
- Rojas ML, Navarrete NA, Elías G, Contreras G. (1999). Efecto de jugos vegetales sobre la producción de *Daphnia pulex* (Cladocera: Daphnidae) en condiciones de laboratorio. *Rev. Biol. Trop.* 47(3): 429-435.
- Romero-Gamboa CM. (2002). Cultivo de pulga de agua. México, 2(57). Disponible en: <http://www.uv.mx/UNIVERSO/57/vuelo/pulga.html>
- Sánchez-Ortiz JR, Sarma SSS, Nandini S. (2010). Comparative population growth of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) exposed to zinc toxicity. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 45: 37–41.
- Torrentera Blanco L, Tacon A. (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura, una diagnosis. FAO Italia, Departamento de Pesca.
- Van Donk E, Kilham SS. (1990). Temperature effects on silicon –and phosphorus- limited growth and competitive interactions among three diatoms. *Journal of Phycology*, 26:40-50.