

Efecto de jugos vegetales sobre la producción de *Daphnia pulex* (Cladocera: Daphnidae) en condiciones de laboratorio

Margarita L. Rojas, Norma A. Navarrete, Guillermo Elías y Gilberto Contreras.

Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala. Av. de los Barrios s/n Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. A.P. 314. C.P. 54090. México. Fax: 390-5900 y 565-1009. Correo electrónico: normaa@servidor.unam.mx.

Recibido 14-VII-1998. Corregido 10-III-1999. Aceptado 18-III-1999.

Abstract: We tested the enriching effect of radish leaf (*Raphanus sativus*) and spinach leaf (*Spinacea oleracea*) extracts when added separately to the fermented wheat bran (*Triticum aestivum*) for producing *Daphnia pulex*. The experiments were conducted in 20 l glass bottles containing 14 l of dechlorinated tap water. The initial inoculation density was 200 organisms/bottle. The cultures were allowed to grow for 21 days; during this time the controls received only the fermented wheat bran (*Triticum aestivum*), while the test containers received either extract of radish leaf (*Raphanus sativus*) or that of spinach leaf (*Spinacea oleracea*), in addition to ferment wheat bran (*Triticum aestivum*). We also measured some physico-chemical variables of the medium during the experimental period. These are: water temperature, dissolved oxygen, pH, conductivity, alkalinity and total hardness. These variables remained more or less the same in all test bottles reflecting non-significant variations. After the test period, the net production of *D. pulex* in terms of numbers was: 1 722 organisms/bottle in the controls while that receiving radish leaf (*Raphanus sativus*) extract with 7 997 organisms/bottle and that with spinach leaf (*Spinacea oleracea*) extract with 8 921 organisms/bottle. Test of analysis of variance showed significant differences among the cultures (Fisher $p < 0.005$). This study showed that the enrichment of fermented wheat bran (*Triticum aestivum*) with spinach (*Spinacea oleracea*) extract was a better nourishing source of food for culturing *Daphnia pulex* under laboratory conditions.

Key words: *Daphnia pulex*, Cladocera, net production, source of food, radish leaf (*Raphanus sativus*) extract, spinach leaf (*Spinacea oleracea*) extract, laboratory conditions.

La producción exitosa de peces y crustáceos con fines acuaculturales depende, entre otras cosas, de la disponibilidad de organismos zooplanctónicos de talla apropiada para la alimentación de sus larvas (Muthu 1982), dado que está extensamente documentado el rol del zooplancton en las cadenas alimenticias acuáticas, siendo la principal conducción de nutrientes entre los productores primarios y los altos niveles tróficos (Conklin & Provasoli 1978).

Recientemente la eclosión de nauplios de artemia se ha vuelto un alimento popular utili-

zado en investigación y acuicultura. Sin embargo, el alto costo de sus quistes ha sido la principal causa de incursionar en organismos zooplanctónicos, los cuales presentan ventajas de cultivo a gran escala y a muy bajo costo, como es el caso de ciliados, rotíferos, copépodos y cladóceros (Muthu 1982).

Dentro de los cladóceros han sido seleccionados los géneros *Daphnia* y *Moina* puesto que ofrecen un alto contenido nutricional y facilidades de producción en cultivo (Torretera & Tacon 1989).

En el caso del género *Daphnia* estas facilidades de producción se deben a importantes cualidades como son: gran resistencia a las variaciones ambientales, corto tiempo generacional, alta tasa reproductiva y a su relativamente poca selectividad como organismo filtrador, lo que facilita la utilización de diversas dietas y la implementación de cultivos masivos (Tech 1982, Torrentera & Tacon 1989).

Los medios de cultivo utilizados son variados, pudiéndose agrupar en: medios minerales, orgánicos y enriquecidos. En este sentido tenemos los trabajos de Nita (1982) quien cultivó *Daphnia pulex* utilizando gallinaza seca y fertilizantes minerales (Urea y Superfosfato Triple), Porras (1982) realizó un cultivo rotatorio de *Daphnia* sp. con gallinaza seca y gallinaza seca combinada con *Spirulina maxima*, Olivares *et al.* (1993) compararon la producción de *Daphnia* sp. utilizando estiércol de caballo y la infusión de estiércol de caballo y jugo de hojas de plantas, Soriano (1995) cultivó *Daphnia pulex* aplicando gallinaza seca a varias concentraciones y comparándolas con un testigo en base a harina de arroz.

El objetivo del presente estudio fue probar el efecto del jugo de hojas verdes como son rábano (*Raphanus sativus*) y espinaca (*Spinacia oleracea*), sobre un patrón de fermento de salvado de trigo (*Triticum aestivum*) en la producción de *Daphnia pulex* (Leydig 1860), en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los cultivos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Producción de Peces e Invertebrados Acuáticos del Campus Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

Para su realización se utilizaron botellas de vidrio de 20 l de capacidad, las cuales fueron llenadas con agua del grifo a un volumen de 14 l y se dejaron reposar por tres días para la eliminación del cloro.

El medio de cultivo patrón para los dos experimentos se preparó con fermento de salvado de trigo (*Triticum aestivum*) (10 ml/l) adiciona-

do con Sulfato de Calcio (0.50 g/l) y Cloruro de Sodio (0.25 g/l) (Secretaría de Pesca-Acuacultura 1983, *In* Torrentera & Tacon 1989).

En el primer experimento la botella testigo tan solo fue alimentada con el fermento de salvado de trigo (*Triticum aestivum*) una vez por semana y las botellas experimentales (I, II y III) con la combinación del fermento de salvado de trigo (*Triticum aestivum*) y el jugo de hojas de rábano (*Raphanus sativus*) a una proporción 1:50, dos veces por semana (Matsudaira 1943, *In* Tech 1982).

En el segundo experimento la variable en las botellas experimentales (I, II y III), fue el jugo de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) a la misma proporción y dosificación.

En ambos experimentos la tasa de siembra de *Daphnia pulex* en todas las botellas (testigo y experimentales) fue de 200 organismos/botella. La cepa de *D. pulex* utilizada en estos experimentos, fue recolectada en noviembre de 1996 de unas piletas del Centro Piscícola "El Zarco", Ocoyoacac, Estado de México y depurada un año en nuestro laboratorio.

El tiempo de cultivo fue de 21 días, durante los cuales se evaluaron dos veces por semana los siguientes parámetros ambientales: temperatura del agua (°C) con un termómetro digital marca Elite, oxígeno disuelto (mg/l) mediante un oxímetro digital marca Cole Parmer, pH mediante un potenciómetro digital marca Cole Parmer; conductividad ($\mu\text{mhos/cm}^2$) con un conductímetro digital marca Sprite 6000; alcalinidad (mg CaCO_3/l) por medio de la titulación con H_2SO_4 al 0.02 N y dureza total (mg CaCO_3/l) por titulación con EDTA al 0.1 M (Anónimo 1989).

Al término de los períodos de cultivo se realizaron las cosechas filtrando el 14.29 % del volumen total de las botellas a través de una red para plancton de 125 μm de luz de malla. La *Daphnia* colectada de todos los recipientes de ambos experimentos fue fijada con formalina al 4 % y almacenada en frascos viales para su cuantificación.

Para conocer la relación de los parámetros ambientales con las producciones de *D. pulex* se realizaron análisis de correlación simple.

Y finalmente para evaluar las diferencias entre los parámetros ambientales evaluados en los dos experimentos y el efecto de los jugos de hojas de rábano (*Raphanus sativus*) y de espinaca (*Spinacia oleracea*) combinado con el patrón de fermento de salvado de trigo (*Triticum aestivum*) en la producción de *D. pulex*, se realizaron análisis de varianza para tres y dos variables de clasificación (técnica de Fisher), a niveles de significancia de 0.99 y 0.995 (Daniel 1985, Reyes 1987).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan los valores máximos y mínimos, el promedio y la desviación estándar de los parámetros físico-químicos evaluados en los dos experimentos que comprendió este estudio. En tanto que en las Fig. 1 (A) y (B) tan

solo se muestran los valores promedio de los mencionados parámetros ambientales.

Como se puede observar en la Fig. 1 (A) no existen grandes variaciones de temperatura del agua, oxígeno disuelto y pH, por ello el análisis de varianza tan solo fue significativo para el pH con $p < 0.01$.

En la Fig. 1 (B) las diferencias en los parámetros de conductividad, alcalinidad y dureza total son algo más evidentes, siendo por tanto significativas para el análisis de varianza obteniéndose en todas una $p < 0.005$.

En cuanto a la producción neta de *Daphnia pulex* a los 21 días de cultivo mostrada en la Fig. 1 (C), esta fue de 1 722 organismos/botella en las testigo, de 7 997 org/botella en las que recibieron jugo de hojas de rábano (*Raphanus sativus*) y de 8 921 org/botella para las del jugo de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*), lo que determinó las tasas de producción

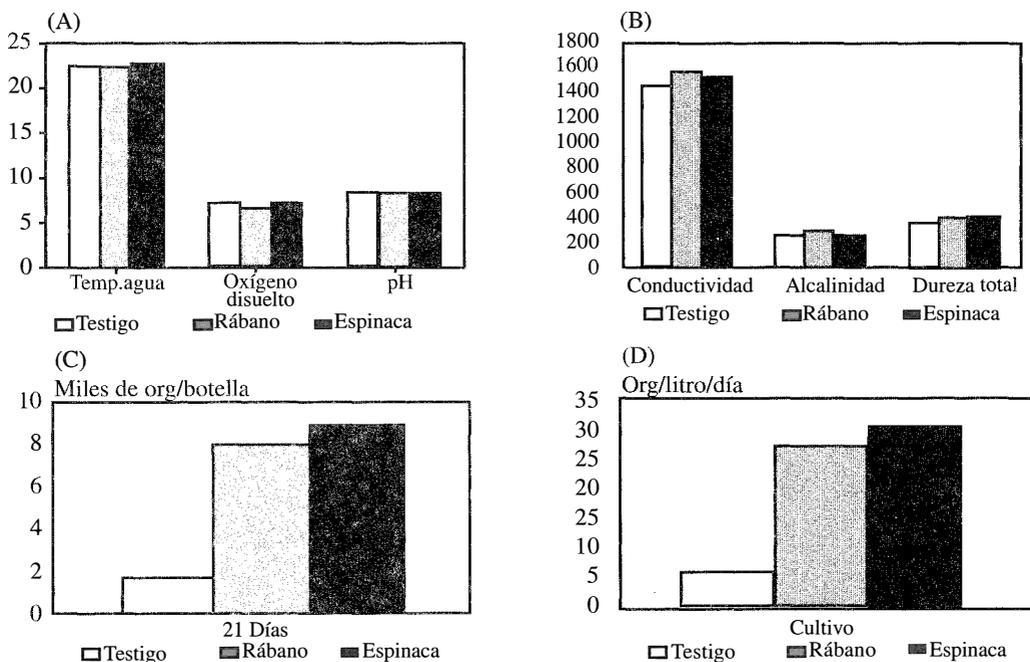


Fig. 1. (A) y (B) parámetro ambientales promedio, (C) producción neta y (D) tasas de producción en los cultivos de *Daphnia pulex*.

CUADRO 1

Parámetros ambientales en los cultivos de Daphnia pulex

Parámetro	Testigo				Rábano				Espinaca			
	máx	mín	prom	ds	máx	mín	prom	ds	máx	mín	prom	ds
Temperatura del Agua (°C)	23.50	21.50	22.45	0.74	23.60	21.20	22.32	0.97	23.40	21.80	22.57	0.58
Oxígeno Disuelto (mg/l)	7.50	6.90	7.20	0.22	7.00	6.10	6.47	0.36	7.40	7.00	7.25	0.15
pH	8.40	8.20	8.32	0.08	8.40	8.10	8.22	0.13	8.30	8.00	8.18	0.12
Conductividad ($\mu\text{mhos}/\text{cm}^2$)	1461.00	1450.00	1455.67	4.18	1567.00	1546.00	1556.17	8.42	1533.00	1511.00	1521.17	8.52
Alcalinidad (mg CaCO_3/l)	270.00	259.50	264.92	4.31	294.00	284.00	290.83	3.76	268.00	243.00	254.50	9.91
Dureza Total (mg CaCO_3/l)	372.30	353.60	358.17	7.10	403.20	384.80	393.07	7.68	420.20	393.10	402.37	10.46

máx = máximo, mín= mínimo, prom= promedio, ds = desviación estándar

siguientes y que se muestran en la Fig. 1 (D): testigo de 5.86 organismos/litro/día, rábano (*Raphanus sativus*) de 27.20 org/litro/día y espinaca (*Spinacia oleracea*) de 30.34 org/litro/día.

Del análisis de correlación simple entre los parámetros ambientales y la producción de *D. pulex*, aquellos que mostraron los valores más altos fueron: la temperatura del agua con una $r = 0.96$ para las testigo y con una $r = 0.94$ para las del jugo de hojas de rábano (*Raphanus sativus*), en el caso de las del jugo de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) este parámetro tuvo una $r = 0.89$ que también es alta, pero aquí destacó de manera particular la correlación obtenida con la alcalinidad con una $r = 0.96$.

Finalmente el análisis de varianza entre las producciones netas obtenidas entre los dos experimentos mostró que sí existen diferencias entre los cultivos por lo que su $p < 0.005$. Sin embargo para detectar si realmente la producción de *D. pulex* con el jugo de hojas de rábano (*Raphanus sativus*) y con el jugo de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) son significativamente diferentes, se realizó otro análisis de varianza con dos variables de clasificación y un nivel de significancia de 0.995, la cual también dio una $p < 0.005$.

DISCUSIÓN

El medio de cultivo patrón preparado en base al fermento de salvado de trigo (*Triticum aestivum*) adicionado con Sulfato de Calcio y Cloruro de Sodio, nos da un medio bastante estable para el desarrollo de *Daphnia pulex*, esto se muestra en el Cuadro 1 y en las gráficas de las Fig. 1 (A) y (B), donde se aprecia que los parámetros físico-químicos evaluados, no mostraron variaciones drásticas, ni existen grandes diferencias entre los registros de los cultivos testigo, con jugo de hojas de rábano (*Raphanus sativus*) y con jugo de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*).

La temperatura del agua tiene relación con la producción de *D. pulex* en las botellas testigo y en las de rábano (*Raphanus sativus*), cuya tendencia general de incremento determinó co-

rrelaciones positivas de 0.96 en las testigo y de 0.94 en las de rábano (*Raphanus sativus*), además consideramos que este parámetro también fue importante para las botellas con jugo de espinaca (*Spinacia oleracea*), ya que en los tres casos la temperatura promedio fue de 22.45, 22.32 y 22.57 °C respectivamente, valores que caen dentro del rango de ocurrencia de la especie en condiciones naturales, indicado por Vázquez *et al.* (1986) entre 15.8 y 24.1 °C.

Autores como Birge (1898), Ward (1940) y Pratt (1943) (*In* Hazelwood & Parker 1961), Hall (1964), Neill (1981) y Crossetti & Margaritora (1987) señalan a la temperatura como el factor físico más importante para determinar el incremento y el tamaño de las poblaciones de cladóceros en ambientes naturales y en condiciones de laboratorio.

En el caso de la alcalinidad mostró una correlación positiva de 0.96 para las botellas enriquecidas con jugo de espinaca (*Spinacia oleracea*), esto evidencia que su incremento favoreció el desarrollo de la *Daphnia*.

Al respecto Borecky (1956) (*In* Hazelwood & Parker 1961) reportó una muy alta correlación entre la densidad total de cladóceros y las concentraciones de bicarbonatos. Esto se apoya en el hecho de que la alcalinidad se refiere a la cantidad y clase de compuestos que en conjunto modifican el pH hacia el lado alcalino de la neutralidad, siendo principalmente los bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos los que la determinan, compuestos que son esenciales en la estabilidad y capacidad amortiguadora de los sistemas dulceacuícolas (Anónimo 1989, Wetzel 1983).

Además debemos agregar que el pH del cultivo enriquecido con espinaca (*Spinacia oleracea*) se ubicó en un rango de 8.00 a 8.30, con un promedio de 8.18 (ver Cuadro 1), valores alcalinos que caen dentro del intervalo óptimo de pH para la especie, que de acuerdo con Davis & Ozburn (1969) es de 7.0 a 8.7 en condiciones de laboratorio y para Vázquez *et al.* (1986) de 7.40 a 8.30 en ambientes naturales.

En cuanto a las producciones netas obtenidas y a las tasas de producción, resulta claro que la adición de los jugos de hojas verdes,

rábano (*Raphanus sativus*) y espinaca (*Spinacia oleracea*), enriquecen el medio patrón y suministran una mayor cantidad de alimento susceptible de ser pastoreado por la *D. pulex*, reflejándose en incrementos de la población del orden de 464% en las de rábano (*Raphanus sativus*) y de 518% en las de espinaca (*Spinacia oleracea*).

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los cultivos. Sin embargo, para conocer si el jugo de hojas de rábano (*Raphanus sativus*) y el jugo de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) son enriquecedores significativamente diferentes, se aplicó un segundo análisis de varianza, el cual nos permitió saber que la producción con espinaca (*Spinacia oleracea*) es definitivamente la mejor alternativa alimenticia para la *D. pulex*, en condiciones de laboratorio, como se planteó en este estudio.

Datos de producciones de *Daphnia pulex* en condiciones de cultivo, solo tenemos las de Nita (1982) quien obtuvo de 0.63 a 1.25 organismos/litro/día utilizando gallinaza seca (200 g/m³) y fertilizantes minerales (Urea y Superfosfato Triple a 20 g/m³) y las de Soriano (1995) con 458 org/litro/día adicionando 250 g gallinaza seca/600 litros.

De acuerdo con nuestras tasas de producción que son de 27.20 org/litro/día en las de rábano (*Raphanus sativus*) y de 30.34 org/litro/día en las de espinaca (*Spinacia oleracea*), resultan mejores que las de Nita (1982), pero inferiores que las de Soriano (1995), sin embargo, consideramos que el uso de estiércoles como la gallinaza seca, no garantizan el estado sanitario de las dafnias cultivadas, pues esos subproductos con frecuencia son portadores de bacterias y de parásitos altamente nocivos incluso para el hombre (Osorio & De la Lanza 1990).

Finalmente debemos enfatizar la relevancia de este tipo de trabajos, por la posibilidad de producir masivamente cladóceros de una forma totalmente aséptica mediante el jugo de hojas verdes, que en algunos casos como el de las hojas de rábano (*Raphanus sativus*) son

desperdicios hortícolas. Esto concuerda con Davis & Ozburn (1969), ya que las daphnias resultan una excelente alternativa alimenticia para diferentes cultivos comerciales de peces y crustáceos, ya sea para el consumo humano o para la ornamentación.

RESUMEN

El objetivo fue probar el efecto enriquecedor del jugo de hojas de rábano (*Raphanus sativus*) y de espinaca (*Spinacia oleracea*), sobre un patrón de fermento de salvado de trigo (*Triticum aestivum*) en la producción de *Daphnia pulex*. Los experimentos se llevaron a cabo en botellas de vidrio de 20 l de capacidad, llenadas con agua del grifo desclorada a un volumen de 14 l. Los cultivos tuvieron una duración de 21 días, durante los cuales las botellas testigo tan solo recibieron fermento de salvado de trigo (*Triticum aestivum*) y las botellas experimentales (I, II y III), en el primer caso recibieron la combinación de fermento y el jugo de hojas de rábano (*Raphanus sativus*), y en el segundo caso el fermento y el jugo de espinaca (*Spinacia oleracea*). La tasa de siembra en ambos experimentos fue de 200 organismos/botella. Durante el desarrollo de los cultivos se evaluaron: temperatura del agua, oxígeno disuelto, pH, conductividad, alcalinidad y dureza total. Los parámetros ambientales se comportaron de manera similar en ambos experimentos, sin mostrar variaciones drásticas, ni grandes diferencias en sus registros. Las producciones netas obtenidas para la *D. pulex* fueron de: 1 722 organismos/botella en las testigo, 7 997 org/botella en las de rábano (*Raphanus sativus*), y de 8 921 org/botella en las de espinaca (*Spinacia oleracea*). De acuerdo con los datos de producción el análisis de varianza encontró diferencias significativas entre los cultivos (Fisher $p < 0.005$) y estableció que la combinación del fermento enriquecido con el jugo de espinaca (*Spinacia oleracea*) es la mejor alternativa alimenticia para la *Daphnia pulex* en condiciones de laboratorio.

REFERENCIAS

- Anónimo. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. Washington. 1193 p.
- Conklin, D.E. & L. Provasoli. 1978. Bifasic particulate media for the culture of filter-feeders. Biol. Bull. 154: 47-54.
- Crosetti, D. & F.G. Margaritora. 1987. Distribution and life cycles of cladocerans in temporary

- pools from Central Italy. *Freshwater Biol.* 18:165-175.
- Daniel, W.W. 1985. Bi estadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa, México, D.F. 485 p.
- Davis, P. & G.W. Ozburn. 1969. The pH tolerance of *Daphnia pulex* (Leydig, emend., Richard). *Can. J. Zool.* 47: 1173-1175.
- Hall, D.J. 1964. An experimental approach to the dynamics of a natural population of *Daphnia galeata mendotae*. *Ecology* 45: 94-112.
- Hazelwood, D.H. & R.A. Parker. 1961. Population dynamics of some freshwater zooplankton. *Ecology* 42: 266-274.
- Muthu, M.S. 1982. Methods of culturing zooplankton. Manual of research methods for fish and shellfish nutrition. Centre of Advanced Studies in Mariculture, Central Marine Fisheries Research Institute. Cochín. p. 119-125.
- Nita, T. 1982. Work on the growing of food organisms at Sakabumi freshwater aquaculture development center and other freshwater stations in Indonesia. South China Sea Fisheries Development and Coordinating Programme. Manila, Filipinas. p. 155-156.
- Neill, W.E. 1981. Developmental responses of juvenile *Daphnia rosea* to experimental alteration of temperature and natural seston concentration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1357-1362.
- Olivares, R., M.L. Rojas & R. Sánchez. 1993. Producción de pulga de agua (*Daphnia* sp.) utilizando dos fertilizantes no convencionales, con algunas consideraciones económicas. Resúmenes. XII Congreso Nacional de Zoología. Monterrey, Nuevo León. México. p. 64.
- Osorio, I. & G. De la Lanza. 1990. El uso de biodigestores en acuicultura. La acuicultura en México: de los conceptos a la producción. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p. 291-309.
- Porras, D. 1982. Aspectos del cultivo rotatorio de *Daphnia* sp. Investigación Acuícola. 1er. Informe de Trabajo. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Secretaría de Pesca y Centro Nacional de Parasitología Animal. México. p. 20-26.
- Reyes, C.P. 1987. Bioestadística aplicada. Trillas, México, D.F. 216 p.
- Soriano, S.M.B. 1995. Utilización de gallinaza en el cultivo de pulga de agua *Daphnia pulex* en estanques de fibra de vidrio. Programa - Resúmenes. XIII Congreso Nacional de Zoología. Morelia, Michoacán. México. p. 118.
- Tech, E. 1982. Culture of zooplankton (*Brachionus* and *Moina*). South China Sea Fisheries Development and Coordinating Programme. Manila, Filipinas. p. 35-58.
- Torrentera, B.L. & A.G.J. Tacon. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. FAO. Documento de Campo No. 12. Programa Cooperativo Gubernamental /Región América Latina /075 /Italia. Brasília, Brasil. 90 p.
- Vázquez, A., E. Solís, N. Macedo & I. Rosas. 1986. Influencia de la calidad del agua sobre la ocurrencia de *Daphnia pulex* en la presa José Antonio Alzate y algunos aspectos de su pesquería. *Cont. Amb.* 2:39-56.
- Wetzel, R.G. 1983. Limnología. Omega, Barcelona. 679 p.