



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CRECIMIENTO Y ESCALAMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DEL NEMÁTODO *Turbatrix aceti* (BRUNN, 1949), PARA SU UTILIZACIÓN EN LARVICULTURA DEL PEZ BLANCO (*Chirostoma estor*).

TESIS QUE PRESENTA:

ALEJANDRA AHUMADA GARCIA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Carlos A. Martínez Palacios (IIAF, U.M.S.N.H.)

Profesor e Investigador Titular “C” Tiempo completo definitivo.

Co-director: Dr. Miguel Ángel Olvera Novoa (CINVESTAV-Mérida)

Investigador CINVESTAV 3D

]

]

]

Morelia, Michoacán, México



Morelia, Mich. Febrero de 2016

DEDICATORIA

A mi hija Tsanda Erandi, carita de luna, has llenado mis días de amor pleno, no me hace falta mas. Por enseñarme a trascender todo obstáculo interno y externo, por enseñarme la paciencia, el respeto y el amor incondicional.

A mi mamá, la persona mas generosa, amorosa y atenta con el bienestar de sus seres queridos, gracias por compartir esta vida con nosotras.

A mi maestro querido Israel Lifshitz quien ha compartido su sabiduría y camino.

A Pedro Alvarado, roca, agua y viento, gracias por compartir.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos A. Martínez Palacios, mentor, asesor académico y consejero de vida.

Al Dr. Miguel Angel Olvera Novoa cuya visión ha ayudado a mi formación, y su perspectiva me ha hecho crecer.

Al Prof. Lindsay G. Ross, amigo, jefe y apoyo incondicional en todos estos años.

A la M. en C. Sibila Santos, querida amiga, apoyo incondicional, maestra.

A la Dra. Mayra Toledo, Dra. Gisela Ríos, Dr. Cristian Martínez y Dr. Jorge Fonseca por su interés y respeto para con mis procesos personales y profesionales.

A Eva, compañera de estudios, de maternidad, siempre amable y amorosa.

A Esther y Lupita Cortés por confiar en mí, por compartir su energía positiva con todos.

A Lupita Torres, fuente de inspiración y fortaleza. A Nancy, Saúl, Ricardo, (s), Jesús, Lázaro, luchadores incansables del Laboratorio de Acuicultura, y a todos los compañeros y amigos que por varios años han acompañado mi camino, a todos y todas, muchas gracias.

Al personal del IIAF, en particular a Moni (IIAF), Ana y Liliana (PICB-UMSNH) personal administrativo que amablemente han atendido nuestras solicitudes y dado seguimiento a los procesos del posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo durante la realización del presente proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	12
<i>I.2 Antecedentes.....</i>	<i>13</i>
<i>I.2.A Nemátodos de vida libre y su investigación en acuicultura.....</i>	<i>13</i>
<i>I.2.B. Alimentación larvaria y alimentos vivos.....</i>	<i>14</i>
<i>I.2.C. Alimentación larvaria de Chirostoma estor.....</i>	<i>14</i>
<i>I.2.D. Nemátodos y su investigación en acuicultura de peces.....</i>	<i>14-21</i>
Medios de crecimiento para nemátodos	
Efecto de la temperatura en el crecimiento de nemátodos	
Separación de nemátodos de su medio	
Consumo de nemátodos en larvicultura	
Desempeño en larvas de peces	
Evaluación de nemátodos en larvicultura	
El nemátodo Turbatrix aceti y su utilización en acuicultura	
II. OBJETIVOS.....	21
<i>II.1. Objetivo general</i>	
<i>II. 2. Objetivos particulares</i>	
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
<i>III.1. Espacio experimental y obtención de organismos</i>	
<i>III.2. Formulación de una Dieta Artificial para Turbatrix aceti</i>	
<i>Experimento 1. Evaluación el crecimiento de Turbatrix aceti en una Dieta Artificial (DA) a diferentes concentraciones y comparación con el Medio Base (MB).....</i>	<i>22</i>
<i>Experimento 2. Evaluación del crecimiento de Turbatrix aceti en una DA a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30, y 35 °C).....</i>	<i>24</i>
<i>Experimento 3. Comparación del crecimiento de Turbatrix aceti en una DA con diferentes fuentes de proteína a diferentes proporciones, antioxidantes y diluciones.....</i>	<i>24</i>
<i>Experimento 4. Evaluación del crecimiento a escala de la población de Turbatrix aceti en una Dieta Artificial Con Aceite(DACA), Dieta Artificial Sin Aceite (DASA), y dieta base de manzana(DB).....</i>	<i>25</i>
<i>Experimento 5. Evaluación del consumo, crecimiento y supervivencia de larvas de Chirostoma estor alimentadas con Turbatrix aceti enriquecidos.....</i>	<i>26</i>

IV. RESULTADOS.....	27
V. DISCUSIÓN.....	31
VI. CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ingredientes utilizados en la formulación de la Dieta Base (DB) y la Dieta Artificial (DA). (P. 22)

Tabla 2. Tratamientos con DA a diferentes concentraciones y el Medio Base. (P. 23).

Tabla 3. Formulación de los diferentes tratamientos para evaluar el efecto del porcentaje y tipo de proteína, antioxidantes y porcentaje de dilución de una DA para *Turbatrix aceti*. (P. 25)

Tabla 4. Supervivencia en larvas de *Chirostoma estor* de 10 dpe alimentadas con el nemátodo *T. aceti* y un control con *Brachionus plicatilis*. (P. 30)

Tabla 5. Muestreo de 5 larvas para conteo de nemátodos *Turbatrix aceti* en el intestino y la longitud de cada larva al finalizar el experimento de 14 días. (P. 30)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Crecimiento de *T. aceti* (Y=Individuos/ml) en un DA a diferentes concentraciones durante 4 semanas (X) comparado con la Dieta Base (DB). En el cuadro se representan las diferentes concentraciones de DA y el control MB. (P. 27)

FIGURA. 2. Densidades finales de *Turbatrix aceti* en un DA a diferentes Temperaturas durante 4 semanas. (P. 28)

FIGURA 3. Crecimiento de *T. aceti* (Individuos/mL) en DA, Dieta Control (DC), Dieta Control con dos fuentes de proteína (DC x 2), Dieta Control al 50% y Dieta Control con dos fuentes de proteína al 50 %. (P=0.001) y el mejor tratamiento fue DA.

(P. 28)

FIGURA. 4. Crecimiento de la población de *T. aceti* utilizando tres Dietas: DA, DA sin aceite y DB. El mejor crecimiento se presentó en la DA sin aceite al día 21 pos inoculación presentando diferencia significativa respecto a los otros tratamientos (P = 0,032). (P. 29).

FIGURA 5. Larva de 10 dpe de *Chirostoma estor* con el intestino ocupado por nemátodos *Turbatrix aceti* al finalizar el experimento de 30 dpe. (P. 31).

FIGURA. 6 Intestino extraído de la larva de *Chirostoma estor* de 10 dpe donde se observan a los nemátodos *T. Aceti* semi digeridos, con lo que se comprueba la capacidad quitinolítica de las enzimas intestinales (P. 31).

RESUMEN

Los nemátodos constituyen un alimento vivo con potencial, debido a sus rápidas tasas de reproducción, pequeño tamaño y posibilidad de enriquecimiento (Brüggemann, 2012). *Turbatrix aceti* es el único nemátodo que se mantiene suspendido en la columna de agua, siendo ventajoso para su utilización en sistemas acuáticos. Los medios para crecimiento de nemátodos pueden ser sólidos o líquidos. *T. aceti* puede ser mantenido en una dieta base (DB) líquida con vinagre y manzana. El crecimiento de *T. aceti* puede mejorar al formular una dieta artificial (DA) que permita su escalamiento. El pez blanco (*Chirostoma estor*) es una especie endémica al Lago de Pátzcuaro en el estado de Michoacán, y fuente alimenticia ancestral para las comunidades Purépechas de dicha región. Debido al deterioro ambiental, a su elevada demanda y precios en el mercado, las poblaciones silvestres de dicha especie han declinado (RNP, 2008). A partir de eso surge la necesidad de investigar aspectos básicos para la acuicultura de *C. estor* (Martínez-Palacios et al., 2002). Una etapa crítica en el ciclo de vida de los peces es la larvaria debido a que durante ésta se presenta la reabsorción del saco vitelino e inicio de la autotrofia (alimentación exógena) (Hoffer y Nassir-Udinn, 1985; Jones y Hude, 1986; Kolkovski et al., 1993; Watanabe y Kiron, 1994). Las larvas deben contar con un alimento que les provea los nutrientes esenciales para cubrir sus requerimientos energéticos para el crecimiento y supervivencia, así como un tamaño adecuado para ser consumido. En la acuicultura de *C. estor*, y similar a lo que sucede en los peces marinos, se presenta una baja supervivencia en las etapas tempranas de desarrollo (Martínez-Palacios, 2002). Las larvas son alimentadas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) hasta los 15 días a partir de los cuales son alimentadas con nauplios de *Artemia salina*, hasta los 30 dpe, tiempo en el que se destetan con alimento artificial, retirando los nauplios de *Artemia*. El pez blanco es selectivo en el tipo de alimento que va a consumir y en su tamaño (Martínez-Palacios et al., 2002). La incorporación de *T. aceti* podría reducir costos, simplificar la producción de alimento vivo y mejorará la supervivencia larvaria. En la presente investigación se evaluó el crecimiento de *Turbatrix aceti* formulando una dieta artificial (DA) y obtener un medio práctico para su producción a escala. Se formuló una DA. Posteriormente se realizó una comparación del crecimiento de *T. aceti* al 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 1.6% de la DA en contraste con el MB. Después se evaluó el efecto de la temperatura para optimizar el crecimiento; Los tratamientos fueron: 10, 20, 25, 30 y 35°C. Además se evaluó el efecto del tipo y porcentaje de proteína en el crecimiento de la *T. aceti*, y esto se logró evaluando cuatro tratamientos: DA, DC, DC 2, DC 50 y DC 2 al 50. Finalmente se diseñó un experimento para el crecimiento *a escala* de la población de *T. aceti* utilizando diferentes dietas: Dieta Artificial Con Aceite, Dieta Artificial Sin Aceite y Dieta Base. Finalmente se evaluó si el nemátodo puede ser consumido por larvas de *Chirostoma estor*. Los resultados demuestran que el crecimiento de *T. aceti* con DA a diferentes porcentajes presenta diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.0001$), y no existiendo diferencia entre el MB y DA al 75 y 100 %. El crecimiento de *T. aceti* a diferentes temperaturas con DA muestra diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.0004$), sin diferencia significativa entre 20 y 25 °C. El crecimiento de *T. aceti* con diferentes fuentes de proteína y porcentajes presentó diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.001$) siendo la DA (1% proteína aislada de soya), el mejor tratamiento. Las larvas de 10 días pos eclosión de *C. estor* consumen el nemátodo *T. aceti*, encontrándose de 50-110 nematodos de *T. aceti* al evaluar el contenido intestinal. Los

resultados de crecimiento de *T. aceti*, así como su consumo en larvas de *C. estor*, demuestra su potencial como alimento vivo complementario para la alimentación larvaria.

Palabras clave: Alimento vivo, nemátodos, *Turbatrix aceti*, Dieta Artificial, *Chirostoma estor*.

ABSTRACT

Nematodes are live feed with potential for aquaculture, due to their rapid rates of reproduction, wide range of small sizes, from less than 10 μm up to 2 mm, and potential for enrichment (Brüggemann, 2012). *Turbatrix aceti* is a free-living nematode and can swim actively and remain suspended in the water column, being this advantageous aspect for its use as live food in aquatic systems. Growing media for the nematodes can be solid or liquid, being the last one more versatile. The nematode *T. aceti* may be kept in a liquid basic medium (BM) consisting of vinegar and apple. However growth of *T. aceti* can be improved by the formulation of an artificial diet (DA) that exceeds the MB and allows scaling in the nematode production for hatcheries. The pescado blanco *Chirostoma estor*, an endemic silverside from Lake of Pátzcuaro, located in the State of Michoacán and it is an ancestral food source for Purepechas and mestizo communities of that region. Due to the environmental degradation of the ecosystem, to its high demand and prices in the local and regional market, wild populations of this species have declined in the Lake (RNP, 2008). This status evidenced the need to learn about the basics for *C. estor* aquaculture, feeding preferences and habits, the influence of environmental factors on the development and survival, Larval feeding, weaning and balanced diets (Martinez-Palacios et al., 2002). One of the critical stages in the life cycle of fish is the larval stage because during this the resorption of the yolk sac and the on setting of autotrophy takes place (Hoffer and Nassir-Udinn, 1985;) Jones and Hude, 1986; Kolkovski et al., 1993; Watanabe and Kiron, 1994) larvae must have a source of feed that provides them essential nutrients to meet all its energy requirements for growth and survival, as well as been attractive enough and in an appropriate size to be able to be consumed by the small-mouthed larvae. In *C. estor* aquaculture, and similarly to what happens in marine fish, presents a low survival in the early stages of development (Martinez - Palacios, 2002). The larvae are initially fed rotifers (*Brachionus plicatilis*) up to 15 days from which are fed with nauplii of *Artemia salina*, until the 30 dpe, time in which are weaned with artificial food, removing the nauplii of *Artemia*. The whitefish is selective in the type of food that is to be consumed, and particles as or more than the size of mouth are rejected (Martinez-Palacios et al., 2002). The incorporation of *T. aceti* have the potential to reduce costs, simplify the production of live food and improve larval survival. The present study evaluated the growth of *Turbatrix aceti* by the formulation of an artificial diet (AD), to set-up the development of a practical and economical diet for the scaling of production. Initially, we conducted a review of the most used medium for the growth of nematodes and formulated an AD. Then performed a comparison of the growth of *T. aceti* at different concentrations of the AD: 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 and 1.6% and contrasted to the BM. The optimal concentration was exposed to different temperatures: 10, 20, 25, 30 and 35° C in order to improve population growth, In addition, and experiment was designed to observe the effect of the type and percentage of protein on the growth of *T. aceti*, and this was evaluated by four treatments: DA (1% isolated soy protein), DC (0.5% protein soya+0.5% protein of corn + bloodmeal 0.05% + 0.1 astaxanthin), DC x 2 (1% P.) Isolated soy protein, 1% corn protein, 0.1% blood meal and 0.1% astaxanthin), DC to 50% (diluted to 50%), and DC x 2 50% (diluted to 50%). Once determined the best growing medium, its percentage and best composition, the main experiment was to test whether the nematode can be consumed by *Chirostoma estor* larvae. Growth of *T. aceti* on a AD at different concentrations presents significant differences between treatments ($P \leq 0.0001$), and the best treatment were AD 100%, 75% and BM. *T.*

aceti growth on AD at different temperatures presented significant differences between treatments ($P \leq 0.0004$), and no difference were found between 20 and 25 C for the diet. The results of growth of *T. aceti* modifying the protein sources and percentages of the AD, presented significant differences between treatments ($P \leq 0.001$) being treatment 1 of AD (1% isolated soy protein), the best treatment. Population growth on DA with oil was statistically different from DA oil free and DB ($P = 0,032$) reaching 30,000 nematodes/milliliter. 10 days post hatch larvae of *C. estor* consumes the nematode *T. aceti*, finding 50-110 nematodes of *T. aceti* in the intestine of each larvae. Results of growth performed by *T. aceti* on an artificial diet, the easy preparation and scaling, the separation protocols, as well as its consumption in *C. estor* larvae, demonstrates its potential as a complementary live feed in the hatcheries.

I INTRODUCCIÓN

El pez blanco (*Chirostoma estor*) es una especie endémica del Lago de Pátzcuaro situado en el estado de Michoacán, fuente alimenticia y económica ancestral para los Purépechas de dicha región. Debido al deterioro ambiental del ecosistema, a su elevada demanda y precios en el mercado local y regional, las poblaciones silvestres de dicha especie se han reducido en el lago de una manera alarmante (RNP, 2008).

Lo anterior evidenció la necesidad de conocer los aspectos básicos para el cultivo de *C. estor*, tales como: hábitos de alimentación, la influencia de los factores ambientales en el desarrollo y supervivencia, primera alimentación, destete y alimentación balanceada (Martínez-Palacios et al., 2002).

Una de las etapas críticas en el ciclo de vida de los peces es la larvaria debido a que durante ésta se presenta la reabsorción del saco vitelino e inicio de la autotrofia (alimentación exógena) (Hoffer y Nassir-Udinn, 1985; Jones y Hude, 1986; Kolkovski et al., 1993; Watanabe y Kiron, 1994) las larvas deben contar con un alimento que provea los nutrientes esenciales para cubrir todos sus requerimientos energéticos y un tamaño adecuado para poder ser consumido. En la acuicultura de *C. estor*, de manera similar a lo que sucede en los peces marinos, se presenta una baja supervivencia en las etapas tempranas de desarrollo (Martínez-Palacios, 2002).

Martínez-Palacios *et al.* (2002), reportan que el pez blanco nace de huevos pequeños (entre 0.9 y 1.2 mm de diámetro) como los peces marinos, muestra una organogénesis incompleta del tubo digestivo al comienzo de la alimentación exógena y su saco vitelino desaparece al sexto día después de la eclosión (dpe) en condiciones de inanición. Otra característica de las larvas antes de la eclosión es que presentan una vesícula biliar de color pálido a verde intenso dos días antes de la eclosión. Se ha detectado actividad enzimática en larvas de tipo tripsina y quimotripsina, lo que hace a ésta especie capaz de digerir proteínas a temprana edad (Martínez-Palacios *et al.*, 2002). Las larvas recién eclosionadas de pez blanco poseen quitinasa (Pohls-Ramírez, 2010) aspecto que se encuentra relacionado con su alimentación pues los organismos de los que se alimentan naturalmente, contienen quitina. En cultivo, son alimentadas inicialmente con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) hasta los 15 dpe a partir de los cuales son alimentadas con nauplios de *Artemia* salina, hasta los 30 dpe, dos alimentos vivos ricos en quitina, posteriormente se destetan con alimento artificial. El pez blanco es selectivo en el tipo de alimento que va a consumir, y las partículas tan o más grandes que el tamaño de boca son rechazadas (Martínez-Palacios et al., 2002).

Actualmente en larvicultura el uso de alimentos vivos se limita a nauplios de *Artemia* sp., y rotíferos (*Brachionus* sp.). Los nauplios de *Artemia* representan el 40% de los alimentos vivos utilizados en acuicultura (Lavens y Sorgeloos, 2000) y a pesar de no ser los alimentos vivos que los peces naturalmente consumen, son fáciles de utilizar y tienen alto valor nutricional (Leger y Sorgeloos, 1992), sus quistes pueden ser almacenados y decapsulados para su posterior utilización. Sin embargo sólo existen algunos sitios en el mundo cuyas capacidades de producción son limitadas y fluctuantes en cantidad y calidad. Esta limitada producción en combinación con una elevada y rápida demanda, ha establecido un elevado precio de mercado a nivel internacional, con cotizaciones en dólares para el quiste de *Artemia* (Sorgeloos y Persoone, 1975; Lavens y Sorgeloos, 2000). La *Artemia* compete en el consumo de micro algas, y cuya finalidad es ser alimento de larvas de camarón y de otras especies que forman el zooplancton (Biedenbach *et al.*, 1989; Rouse et al., 1992). Además, los nauplios de *Artemia* son muy grandes para poder ser consumidas por las primeras larvas de muchas especies de peces (Sautter *et al.*, 2007). Conceição *et al.*, (2003) han sugerido que tanto las *Artemias* como los rotíferos pueden estar deficientes en varios aminoácidos. Respecto a los rotíferos, aunque son adecuados para larvas que prefieren presas pequeñas o para larvas recién eclosionadas (Lubzens, 1987), Hirata (1980) reporta que la producción de rotífero es una limitante en la producción de peces en la acuicultura de Japón, y su producción requiere trabajo continuo e implica un costo adicional importante para la producción (Lavens and Sorgeloos, 1996).

La poca disponibilidad de alimentos vivos puede ocasionar ocasionalmente desequilibrios o deficiencias nutricionales (Watanabe 1993; Izquierdo 1996).

En la búsqueda de alimentos que incrementen la supervivencia durante la larvicultura de peces de importancia biológica y comercial, Brüggemann (2012) resume que los alimentos vivos son esenciales en la nutrición larvaria en la mayoría de las especies acuáticas y que a medida que aumenta la demanda de productos de la acuicultura, también lo hará la demanda de alimentos vivos. Para satisfacer dicha demanda se ha iniciado una etapa de investigación en alimentos vivos innovadores, como los nemátodos (Phylum: Nematoda) un alimento de calidad con potencial para la alimentación larvaria de peces y crustáceos.

Existen diversos métodos y medios de cultivo para nemátodos de vida libre tales como: métodos de colecta, cultivo, alimentación y enriquecimiento. La experiencia indica que los nemátodos poseen un gran potencial como alimento para larvas de peces y crustáceos. Especies como *Panagrellus redivivus*, *Turbatrix aceti* y *Caenorhabditis elegans* han sido ampliamente estudiadas por sus rápidas tasas de reproducción y los sencillos medios de cultivo que requieren. Se ha encontrado que al enriquecer los medios de cultivo con aceites que contienen ácidos grasos esenciales (AGE), llegan a ser ingeridos por estos nemátodos y constituir parte de su cuerpo y así es posible llevar estos AGE a los peces que los consuman, cubriendo los requerimientos esenciales de las diferentes especies en cuestión.

También ha sido demostrado que estas especies de nemátodos pueden ser digeridos por las larvas a pesar de poseer una robusta cutícula quitinosa que los protege (Hofsten *et al.*, 2006).

El presente trabajo evaluará el potencial de utilización del micro nemátodo *Turbatrix aceti* (Peters, 1928) y su crecimiento *a escala* para ser utilizado como primer alimento en larvas del pez blanco (*Chirostoma estor*).

El nemátodo *Turbatrix aceti* ha sido elegido por las siguientes características: a) Su potencial para producción a escala masiva, suficiente para alimentar larvas de peces pequeños como los peces marinos y peces de agua dulce como el pescado blanco; b) la simplicidad de su cultivo; c) Su adecuado tamaño (Diversos tamaños: De 3-250 μm); d) Hábitos de nado en la columna de agua, tal como los miembros del zooplancton del que se alimentan la mayoría de peces y crustáceos (Peters, 2013); e) Potencial de ser enriquecidos con nutrientes como ácidos grasos esenciales (AGE), vitaminas, probióticos y otros agentes, como los terapéuticos utilizados en acuicultura que podrían ser utilizados de manera puntual (Brüggemann, 2012).

1.2 Antecedentes

1.2.A Nemátodos de vida libre y su investigación en acuicultura

En la búsqueda de alimentos que incrementen la supervivencia durante la larvicultura de peces de importancia biológica y comercial, Brüggemann et al (2012) resumen que los alimentos vivos son esenciales en la nutrición larvaria en la mayoría de las especies acuáticas y que a medida que aumenta la demanda de productos de la acuicultura, también lo hará la demanda de alimentos vivos.

Para satisfacer dicha demanda ha iniciado una etapa de investigación en alimentos vivos innovadores, como los nemátodos (Phylum: Nematoda) un alimento de calidad con potencial para la alimentación larvaria de peces y crustáceos.

I.2.B. Alimentación larvaria y alimentos vivos

Se conoce poco acerca de los requerimientos nutricionales en larvas de peces marinos (Holt, 2011) y tanto cualitativa como cuantitativamente difieren de los presentes en juveniles y adultos, esto debido a cambios tanto morfológicos como fisiológicos, incluyendo su metamorfosis durante la ontogénesis. Sumado a lo anterior los peces crecen rápidamente, su alimentación es continua y debido a esto la ingesta total de nutrientes debe ser elevada. Los requerimientos de los diferentes nutrientes son utilizados a diferentes ritmos de utilización dependiendo de la etapa de desarrollo y la tasa de crecimiento (Hamre, et al. 2013). A pesar de los esfuerzos globales dirigidos al desarrollo de dietas formuladas y la adaptación de técnicas para reducir los volúmenes que son requeridos, el uso de los alimentos vivos en las plantas de producción para crías de peces y crustáceos resulta esencial y se estima que continuará así durante el futuro cercano. Las cadenas tróficas artificiales implementadas en plantas de producción para larvas de peces y crustáceos se encuentran constituidas por tan solo algunas especies del zooplancton: Microalgas, rotíferos, Artemia y copépodos. Los rotíferos debido a su pequeño tamaño son ampliamente utilizados durante las etapas larvarias en peces y camarones. Sin embargo los requerimientos de manejo en los cultivos son muy elevados y no siempre confiables, presentándose con frecuencia caídas repentinas de la producción. Las Artemias son ampliamente utilizadas debido a la facilidad de su uso al ser decapsuladas en 24 horas a partir de quistes en dormancia y ser utilizadas cuando así se requiere. Sin embargo los costos en el mercado para quistes de Artemia son elevados y sólo existen algunas compañías que los distribuyen. Los copépodos son considerados superiores en términos nutricionales (En particular para larvas de peces marinos), debido a que contienen elevados valores de ácidos grasos altamente insaturados y un mejor balance entre clases de triglicéridos y fosfolípidos. A pesar de que existe un progreso considerable en su cultivo, las técnicas para su cultivo a nivel comercial son escasas.

*I.2.C. Alimentación larvaria de *Chirostoma estor**

Las larvas del pez blanco *Chirostoma estor* son zooplanctófagas y totalmente adaptadas a la alimentación con alimentos vivos tales como rotíferos y Artemia. El alimento que les es proporcionado en acuicultura son neonatos de rotífero, rotíferos adultos, nauplios de Artemia y Artemia adulta en ese orden durante los primeros 30 dpe (Martínez-Palacios et al., 2002).

I.2.D. Nemátodos y su investigación en acuicultura de peces

Brüggemann (2012) hace hincapié en la necesidad de encontrar alimentos alternativos en la alimentación larvaria en acuicultura, así como para especies con requerimientos en tamaño y composición particulares. El mismo autor presenta autores que han realizado diversos experimentos con nemátodos (Phylum: Nematoda) en diversas especies de peces y crustáceos con resultados alentadores. Esfuerzos como los de Buck et al (2015) respecto a la evaluación de dietas para el cultivo a escala de *Turbatrix aceti*, *Panagrellus redivivus* y *C. elegans* constituyen elementos a considerar para el cultivo de los nemátodos y su incorporación a los esquemas de alimentación en acuicultura.

Medios de crecimiento para nemátodos

Los principales medios de crecimiento para nemátodos de vida libre han sido evaluados en especies como *Panagrellus redivivus*, *Turbatrix aceti* y *Caenorhabditis elegans* y las mayores ventajas de dichos medios es que son sencillos y pueden alojar a las poblaciones durante períodos largos sin necesidad de ser renovado.

Brüggemann (2012) reporta los principales métodos utilizados para el cultivo y separación de nemátodos, y en particular la especie *Panagrellus redivivus* en medios sólidos, para lo que resulta fundamental considerar la separación correcta del medio de cultivo y los nemátodos para evitar introducir partículas a los sistemas de acuicultura donde se ofrecerá el alimento. Los métodos de cultivo han sido evaluados a pequeña escala pero aún no existe la metodología para escala comercial o industrial, éstos métodos involucran la migración de nemátodos a contenedores fuera de su medio de cultivo en busca de oxígeno o de alimento, o bien por cambios en la temperatura (Bruun,1949; Winkler and Pramer, 1961; Ivleva, 1969; Kahan and Appel, 1975; Wilkenfeld et al. 1984; Biedenbach et al. 1989; Radwin and Rouse 1990; Rouse *et al.* 1992; Santiago et al. 2003, 2004; Sautter *et al.* 2007).

Los principales medios de cultivo utilizados para la especie *Panagrellus redivivus* la cual se alimenta principalmente de bacterias y de levaduras:

Lower *et al.* (1970), Moens y Vincx (1998) han reportado que *P. redivivus* puede ser cultivado axénicamente pero que el crecimiento de su población puede mejorar significativamente si son incorporadas bacterias a su medio, aunque en exceso puede causar mortalidad en los nemátodos.

Existen algunos estudios donde se han incorporado bacterias al medio (Kumlu *et al.* 1998; de Lara *et al.* 2007), también se ha incorporado *Spirulina* sp. que es una cianobacteria (Lara *et al.* 2007) con la cual se logró un rápido crecimiento de la población alcanzando densidades máximas de 194.290 ± 27.910 nemátodos/g de medio y 143.660 ± 8020 nemátodos/g de medio con avena sin *Spirulina*). En algunos estudios se agregaron levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Rottmann *et al.* 1991; Ricci *et al.* 2003). Schlechtriem *et al.* (2004b) y Rottmann (1988) sugieren que *P. redivivus* se alimenta de levaduras; Radwin y Rouse (1990) descubren que la presencia de levaduras aumenta la producción de nemátodos sólo en la primer semana, y si las levaduras son incorporadas una vez por semana el efecto positivo en la producción puede durar más tiempo.

En la mayoría de los estudios utilizando medios de crecimiento sólido, se utilizan diversos tipos de harinas o fuentes de almidones. Focken *et al.* (2006) utilizan una combinación de harina de trigo y harina de maíz (50:50) o harina de avena. Rouse et al. (1992) utilizó harina de trigo enriquecida con aceite de pescado y levaduras, Schlechtriem et al. (2004c, 2004d, 2005) enriqueció harina de trigo, harina de avena o harina de maíz con diferentes tipos de aceites mientras que Rottmann et al. (1991) y Rottmann (1988), agregaron levadura a la harina de avena.

Ricci et al. (2003) comparó un medio estándar con harina de avena (16.7 % harina de avena en una solución salina al 0.8%) contra un medio con ingredientes purificados (PIM) consistente en un 1.64 % de Peptona de carne, 0.94 % de extracto de levadura, 12.6 % de almidón de maíz, 0.24 % glucosa, 1.48 % aceite de semilla de girasol, disueltos en una solución de sal de mar a 0.8%. Los nemátodos alimentados con el PIM presentaron un incremento en el factor de multiplicación y en la producción total comparados con el medio estándar. Con el PIM se cosecharon $330,000 \pm 15,000$ nematodos/ g de medio (241,000 n/g en medio estándar), y el hecho de que los ingredientes sean solubles permite la cosecha más sencilla de los nemátodos.

La variedad de medios de cultivo para *P. redivivus* revela la versatilidad de la especie (Radwin & Rouse 1990): harina de avena en agar, frijol pinto, lentejas, chícharos verdes, suero de queso seco, harina de semilla de algodón, alimento para camarón y masa de maíz

Wilkenfeld *et al.* (1984) utilizando masa de maíz obtuvo cosechas de 40,000 – 50,000 nemátodos/cm² diariamente en una capa de 1.5 cm.

Kumlu *et al.* (1994, 1998) cultivaron nemátodos mono axénicamente en medio líquido constituido por: 10 % de homogeneizado de riñón de cerdo, 1 % de levadura, 3.5 % aceite de maíz, y agua inoculada con bacterias *E. coli*, y obtuvieron densidades de 230,000 nemátodos/ mL.

Kahan and Appel (1975) evaluaron como *P. redivivus* puede adaptarse a la salinidad, importante cuando los nemátodos son utilizados para la alimentación de larvas de peces o crustáceos marinos. Los nemátodos pudieron crecer a salinidades de 30 durante 8 horas sin afectar su actividad.

Efecto de la temperatura en el crecimiento de nemátodos

Winkler y Pramer (1961) encuentran que el crecimiento de la población de nemátodos depende en gran medida de la temperatura de cultivo, y sugieren una temperatura de cultivo de 20 °C para *Panagrellus redivivus*, y que a 28 °C el crecimiento de la población declina. Ricci *et al.* (2003) los mantuvieron a 25 °C, Kumlu *et al.* (1994, 1998) a 22 °C, y Rouse *et al.* (1992) a 20–24 °C. Para sostener un buen crecimiento de la población, la temperatura debe ser mantenida en el intervalo de temperaturas ya mencionadas, ligeramente arriba de 20 C.

Separación de nemátodos de su medio

Existen técnicas complejas de cultivo y diferentes métodos de separación (Ricci *et al.* 2003; Focken *et al.* 2006; Sautter *et al.* 2007; Schlechtriem *et al.* 2004a, 2004b, 2004c, 2004d, 2005). Hooper (1986) and Barière and Felix, (2006), plantean un método de separación por medio de la gravedad específica de los nemátodos agregando sucrosa, sulfato de magnesio (MgSO₄) o Sílice Coloidal, de manera que los nemátodos flotan y pueden ser colectados en la superficie con una pipeta. Santiago *et al.* (2004) hizo flotar a los nematodos utilizando una solución al 40% de sacarosa, lo cual también ayuda a eliminar partículas de medio.

Separación de medios líquidos

Respecto a los métodos de cultivo en medio líquido se argumenta que es un medio más sencillo debido a que no es necesario retirar las partículas sólidas del mismo (o es menor la cantidad de las mismas). Kumlu y Fletcher (1997) han propuesto un método con esponjas cúbicas empapadas con medio de cultivo enriquecido con ácidos grasos eicosapentaenoico y docosaheptaenoico así como el pigmento asthaxantina. Fisher C.M.L. y Fletcher (1995) patentaron un medio de cultivo líquido que no ha sido publicado aún. Kumlu *et al.* (1998) probó un medio líquido colocado en matraces y mantenidos en incubación de 10 a 22 días hasta su cosecha. Los nemátodos fueron centrifugados y limpiados en un proceso repetitivo de suspensión en agua, sedimentación y decantación. Recientemente Buck *et al.* (2015) probó medios líquidos para el crecimiento de la población de *T. aceti*, *P. redivivus* y *C. elegans* en los cuales separan los nemátodos por filtración a diferentes tamaños (micras).

Consumo de nemátodos en larvicultura

Los nemátodos pueden ser digeridos por larvas de peces a pesar de poseer una robusta cutícula quitinosa que los protege (Hofsten *et al.*, 2006).

Kahan (1979) reportó que en *Mugil capito*, que presentan larvas muy pequeñas, al proporcionar nemátodos las larvas recién eclosionadas se alimentaron activamente y

encontrando nemátodos en el intestino a las 5 horas. Santiago *et al* (2004) examinaron el intestino en larvas de carpa cabezona *Hypophthalmichthys nobilis*, alimentadas con nemátodos y encontraron que la larva prefiere nemátodos pequeños en los primeros 4 días.

Schlechtriem *et al.* (2005) reportan que la digestibilidad de los nemátodos depende en gran medida de la especie a la que son ofrecidos, en particular depende del desarrollo del estómago en etapas tempranas. Las larvas con estómagos funcionales (ejemplo: Salmonidos), al principio de la primera alimentación, presentaran menos problemas de digestibilidad de nemátodos que aquellas que permanecen sin estómago (ejemplo: Ciprinidos) o aquellas en las que se desarrolla posteriormente (Ejemplo: Coregónidos).

Hofsten *et al* (1983) ofrecieron diferentes especies de nemátodos (*P. redivivus*, *T. aceti*, *C. elegans* y *C. briggsae*) a adultos de pez Zebra, *Danio sp.* para analizar al microscopio la manera en que son digeridos. Schechtriem *et al* (2005) examinaron el intestino de la larva de pez blanco, *Coregonus lavaretus* alimentados con nemátodos. Treinta minutos post alimentación los nemátodos fueron encontrados en el intestino así como las partes no digeridas (cápsulas bucales y espículas), y les tomó de 3 a 6 horas a la larva el digerir totalmente a los nemátodos, aunque son capaces de sobrevivir en el intestino varias horas e incluso abandonar el intestino vivos. Schechtriem *et al.* (2004) probaron la asimilación de nemátodos a través de isótopos en larvas de carpa común. El patrón isotópico estuvo fuertemente influenciado por el nemátodo de manera tal que los niveles C13 aumentaron en la larva mientras se alimentaba de nemátodos.

Desempeño en larvas de peces

Schlechtriem *et al* (2004a) alimentaron con nemátodos enriquecidos con aceite de girasol o aceite de pescado y nauplios de *Artemia* a larvas de carpa común *Cyprinus carpio*. Ambos métodos de enriquecimiento generaron buenas tasas de supervivencia después de 7 días con 90.1 y 84.3 % respectivamente. Sin embargo en la dieta con *Artemia sp.* la supervivencia fue mayor (97 %); las larvas fueron significativamente más pesadas (382.3 ug y 1626.5 ug) y presentaron una longitud mayor (Artemia: 11.6 mm, Semilla girasol: 7.1 mm, Aceite de pescado: 7.3 mm) y se desarrollaron más rápido que las larvas alimentadas con nemátodos.

En otro trabajo Schechtriem *et al* (2004c) cultivaron nemátodos en un medio a base de harina de trigo y harina de maíz enriquecidos con aceite de trigo o aceite de maíz. Las larvas alimentadas con los nemátodos del tratamiento a base de harina de trigo crecieron más rápido, esto lo atribuyen a una mayor presencia de lípidos y los valores energéticos mayores aunque la proteína es mayor en el medio a base de harina de maíz.

Kahan *et al* (1980) examinaron el desempeño en la carpa común (*C. carpio*) y carpa plateada (*H. Molitrix*). Los alimentos ofrecidos a la primera fueron: nemátodos *P. redivivus*, mezcla de “alkan yeast” (*Candida lipolytica*), alimento para larvas de peces de ornato y alimento comercial para trucha (iniciador). Con los nemátodos y alimento para truchas el crecimiento fue el más elevado (1.75 mg/individuo después de 14 hrs) seguido por los peces alimentados con solo nemátodos (1.25 mg).

Por otro lado la carpa plateada fue alimentada en seis diferentes grupos: 1) Nemátodos *P. redivivus*, 2) Alkan yeast, alimento seco para acuarios y alimento comercial para truchas (iniciador), 3) Alimento de grupo 2 + *P. redivivus*, 4) Alkan yeast, 5) Alkan yeast + nemátodos, 6) Grupo control sin alimentar. A partir del día 11 el crecimiento larvario en los

grupos con nemátodos, y la coalimentación con nemátodos presentó las más elevadas supervivencias de alrededor del 90 %.

Rottman *et al.* (1991) evaluaron supervivencia y crecimiento en carpa cabezona (*H. Nobilis*) y carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) alimentadas con nemátodos en comparación con dietas con nauplios de *Artemia sp.*, rotíferos y diferentes alimentos vivos. La dieta a base de nemátodos presentó la mayor tasa de supervivencia (95.1 %) comparada con otros alimentos vivos (*Artemia* 87% y rotíferos 77.2%). En la carpa herbívora los nemátodos resultaron ser un excelente alimento vivo incluso en las dietas sin otros alimentos. Sin embargo después de la segunda semana deben ser remplazados por alimentos de mayor tamaño. En la carpa cabezona, las larvas presentaron una muy elevada supervivencia (98.4 y 96.1 % respectivamente) similares a las máximas tasas de supervivencia alcanzadas con rotífero y *Artemia sp.* Existió una pequeña diferencia en peso seco o longitud en larvas alimentadas con *Artemia sp.* o nemátodos. Este experimento comprueba que los nemátodos pueden remplazar a los rotíferos en las dietas para larvas de carpa herbívora y carpa cabezona.

Schlechtriem *et al* (2004) investigaron el efecto de la composición química en nemátodos sobre el crecimiento y supervivencia larvaria de la carpa común y pez blanco común *Coregonus lavaretus*; el medio de cultivo para los nemátodos fue enriquecido con aceite de semilla de girasol o aceite de hígado de bacalao para lograr manipular su composición. También fue analizado el perfil de aminoácidos. Las larvas fueron alimentadas con: 1) zooplancton congelado, 2) nemátodos cultivados en harina de avena, y 3) nemátodos en harina de avena + aceite de girasol. Después de 21 días se presentaron diferencias significativas en las tasas de supervivencia en el tratamiento 3 (87.8%+-6.9%) comparado con el tratamiento 2 (58.7%+- 7.8%), el tratamiento con 1 presentó supervivencia de 82.9 +-7.9%. Los tratamientos 1 y 3 presentaron crecimientos similares con una pequeña ventaja para el tratamiento 1. El crecimiento fue significativamente menor en el tratamiento 2. En los tratamientos 1 y 3 las larvas se desarrollaron para el destete y primera alimentación con alimento seco.

Por su parte, en *Coregonus lavaretusc* no se apreciaron diferencias significativas en la supervivencia o crecimiento entre las larvas alimentadas con nemátodos enriquecidos con aceite de girasol o de pescado (ambas alrededor del 84%) después de 14 días.

Santiago *et al* (2004) evaluaron la densidad óptima de nemátodos ofrecidos a larvas de carpa cabezona. Las larvas fueron alimentadas dos veces al día con 50, 75, 100, 125 y 150 nemátodos/mL, y nauplios de *Artemia sp.* como grupo control. A partir de la 3a semana las tasas de crecimiento incrementaron en las densidades de 125 y 150 n/mL. Las larvas fueron más pesadas y su grasa cruda fue significativamente mayor mientras más nemátodos fueron ofrecidos. Por otro lado la proteína cruda disminuyó al aumentar las tasas de alimentación. El tratamiento con *Artemia sp.* presentó las mayores tasas de crecimiento y la supervivencia con nemátodos fue mayor cuando la densidad fue de 100/mL (81.3+- 3.1%). La mortalidad acumulativa fue constantemente elevada en el tratamiento con *Artemia sp.* y en el tratamiento con nemátodos la mortalidad se incremento gradualmente durante todo el experimento.

Santiago *et al* (2003) reportaron la supervivencia en larvas de carpa cabezona alimentadas con *P. redivivus* a diferentes densidades (5-30/mL y 50/mL) las cuales no presentaron diferencias significativas (71.2+- 4.9% y 72.7+- 10.5%) mientras que con *Artemia* las

supervivencias fueron de 87.8+-2.3% y 75.0+-2.6%. Sin embargo, la longitud y peso aumentan conforme más nemátodos son ofrecidos. En el mismo estudio se ofrecieron nemátodos al bagre asiático *Clarias macrocephalus* así como gusanos *Tubifex* y *Artemia* (1er experimento). En un 2o experimento se evaluó el efecto de *Artemia* y nemátodos co-alimentados con alimento seco. Los resultados fueron aquí mejores en *Tubifex* y *Artemia* por lo que no es recomendable utilizar nemátodos para dicha especie.

Sauter *et al* (2007) evaluaron al bagre *Syntodontis petricola* cuyas larvas se alimentaron con *P. redivivus*, *Artemia*, y alimento seco. También evaluaron el enriquecimiento con ácidos grasos. Las larvas alimentadas con nauplios de *Artemia* crecieron ligeramente más rápido. La máxima supervivencia alcanzada con nemátodos no difiere significativamente a las tasas de supervivencia con *Artemia* dependiendo en la densidad de nemátodos. El alimento artificial fue inferior en sostener crecimiento y supervivencia. El enriquecimiento con la emulsión de enriquecimiento con lípidos SuperSelco no tuvo el efecto deseado en las tasas de supervivencia, donde la supervivencia fue 8.5% más baja que en nemátodos no enriquecidos (58.5%). El crecimiento sin embargo incrementó significativamente con los nemátodos enriquecidos. Los autores recomiendan ofrecer 5000 n/larva/día como remplazo de dietas secas. En el crecimiento larvario los nemátodos pueden competir con *Artemia* mientras se ofrezcan 10,000 n/larva/día.

Las larvas de Malabar danio *Malabaricus danio* (un pez tropical) presentaron elevadas tasas de mortalidad (80%) en los primeros 7 días alimentadas con *P. redivivus*. y con dietas secas la mortalidad fue aún mayor (100 % después de 14 días). Las larvas fueron alimentadas *ad libitum* sin medir la densidad de nemátodos en los tanques. Las bajas tasas de alimentación pudieron haber causado el mal desempeño en las larvas de dicha especie (Kahan y Apple 1975, en Bruggeman, 2012).

En el mismo estudio los nemátodos fueron ofrecidos a guppies *Poecilia reticulata* para determinar crecimiento y utilización del alimento. Alimentadas con nemátodos las larvas no crecieron más rápido comparado con una dieta control (Vitawil). Después del día 15 sin embargo, el crecimiento fue significativamente más rápido. Los datos sobre supervivencia no fueron presentados.

En síntesis, los nemátodos son un alimento muy adecuado para la carpa herbívora con excelente crecimiento y supervivencia. También son recomendables para carpa cabezona. En la carpa común los nemátodos enriquecidos funcionan muy bien para mejorar el desempeño. En larvas de bagre *C. macrocephalus* sin embargo, los nemátodos no son recomendables. Al existir diferencias entre especies respecto al uso de nematodos como único alimento o como alimento suplementario, los nematodos son un alimento que puede resultar importante como suplemento o incluso como reemplazo de los alimentos vivos dependiendo de la especie de pez o crustáceo a evaluar.

Evaluación de nemátodos en larvicultura

La más prominente ventaja en los nemátodos es su alta tasa de reproducción. Wilkenfeld *et al* (1984) reportaron que los costos de producción son menores para nemátodos que para *Artemia sp.* y los costos de producción podrán ser reducidos al desarrollar medios de producción estandarizados y sofisticados. La composición química de los nemátodos puede modificarse, particularmente en términos de ácidos grasos, lípidos y contenido de proteínas, esto permite a los laboratorios de producción de peces a proveer los nutrientes necesarios y en cantidades adecuadas para las larvas. La composición de ácidos grasos puede ser

diseñada de acuerdo a las diferentes necesidades de las especies de peces o crustáceos si se eligen bien los ingredientes y métodos de enriquecimiento. Sin enriquecimiento los nemátodos no pueden cubrir los requerimientos nutricionales en larvas. Los nemátodos pueden ser utilizados como vectores de sustancias farmacéuticas o de otra índole y al ser enriquecidos pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo sin perder sus cualidades nutricionales.

La composición de aminoácidos en nemátodos es generalmente similar a *Artemia sp.* y debido a que es bien conocido que es un alimento adecuado para varias larvas de peces, es razonable pensar que los nemátodos pueden generalmente satisfacer los requerimientos en larvas de varias especies.

Tanto rotíferos como nauplios de *Artemia sp.* consumen microalgas. Los nauplios de *Artemia sp.* lo hacen una vez que se agotan sus reservas internas. Sin embargo los nemátodos bacteriófagos como *P. redivivus*, *T. aceti*, o *C. elegans* no consumen algas y por lo tanto no compiten con las larvas por las microalgas que también suelen ser un alimento larvario.

Los nauplios de *Artemia* se encuentran en el proceso de rápido crecimiento y si son coalimentados con algas, están provistos de suficiente alimento para un adecuado crecimiento. Esto puede generar que los nauplios que no son consumidos crezcan demasiado grandes para ser consumidos por muchas larvas. Esto no ocurre con los nemátodos ya que éstos no crecen más allá de 1-2 mm de longitud. El intervalo de longitudes en nematodos es más constante que en *Artemia*.

Debido a la incapacidad para la mayoría de los nemátodos de nadar, éstos deben ser artificialmente suspendidos, (excepto *T. aceti*) para que las larvas puedan consumirlos en la columna de agua.

El nemátodo *Turbatrix aceti* nada activamente y permanece en la columna de agua, de éste modo no es necesario tomar medidas para mantener a los nemátodos en suspensión. Sin embargo las ventajas de *T. aceti* como alimento vivo para larvas en términos de cualidades nutricionales y su capacidad de soporte del desempeño larvario no ha sido probada aún.

La definición de *Turbatrix aceti* es un micronemátodo que se alimenta de microorganismos fermentadores que producen por ejemplo, vinagre. Algunos de los sinónimos son Anguilulla aceti, gusano de vinagre, anguilula, etc.

El nemátodo Turbatrix aceti y su utilización en acuicultura

T. aceti conocido como anguila del vinagre se encuentra con frecuencia en el vinagre (ácido acético CH₃CO₂H y agua) y en frutas en descomposición en donde se alimenta de las bacterias que fermentan el etanol para formar ácido acético y de levaduras utilizados para producir vinagre. *T. aceti* está adaptado para vivir en medios con pH bajo (ácido = 3). De acuerdo a Brunn (1949), *T. aceti* puede alcanzar hasta 1900 µm (machos) y 2560 µm (hembras) en su longitud con, aunque las crías pueden medir menos de 10 µm. Este nemátodo vivíparo se reproduce rápidamente con un promedio de 15 larvas por hembra, aunque pueden producir hasta 45 larvas cada 8-10 días. Pueden vivir hasta 10 meses.

Brüggemann (2012) en su revisión sobre nemátodos en acuicultura, destaca un aspecto poco común de *T. aceti*, su habilidad para nadar activamente. Los nemátodos no son organismos que forman parte del plancton y no son capaces de nadar. Sin embargo *T. aceti* es capaz de

adaptarse, aunque no es un organismo acuático. A diferencia de otros nemátodos que lentamente se hunden, *T. aceti* permanece en forma constante en la columna de agua y no requiere ser mantenido en suspensión (ejemplo: aireación). Es un alimento vivo muy utilizado en acuarofilia y pueden sobrevivir varios días en agua dulce. En cuanto a su medio de cultivo Hofsten *et al.* (1983) recomienda su cultivo en vinagre de manzana.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento y escalamiento en la producción del nemátodo *Turbatrix aceti* (Brunn, 1949) con una Dieta Artificial (DA) para su uso en larvicultura del pez blanco *Chirostoma estor*.

II.2. Objetivos Particulares

- 1) Evaluación de la densidad de *Turbatrix aceti* en una Dieta Artificial (DA) y compararlo con su Dieta Base (DB).
- 2) Evaluación de la densidad de *Turbatrix aceti* en una DA a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30, y 35 °C).
- 3) Comparación de las densidades de *Turbatrix aceti* en una DA con diferentes fuentes de proteína a diferentes proporciones, antioxidantes y concentraciones.
- 4) Evaluación de la densidad de *Turbatrix aceti* con una DA con aceite y sin aceite.
- 5) Evaluación del consumo de *Turbatrix aceti* en larvas de pez blanco, *Chirostoma estor*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Espacio experimental y obtención de organismos

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales - Unidad San Juanito, perteneciente a la Universidad Michoacana. El laboratorio cuenta con una planta para la producción de larvas, de pez blanco (*Chirostoma estor*) y diversas áreas para su crecimiento y reproducción. Los experimentos con nemátodos se realizaron en el laboratorio analítico y el experimento con larvas de *C. estor* en el área experimental del laboratorio. Los nemátodos fueron donados por el Dr. Carlos Strüssmann, de la Universidad de Pesquerías y Acuicultura, Tokio, Japón. A partir de una muestra de nemátodos envuelta en papel con ácido acético, se escaló la producción a diferentes volúmenes para realizar los experimentos.

III.2. Formulación de una Dieta Artificial para *Turbatrix aceti*

Se realizó una revisión bibliográfica para determinar los medios de cultivo para nemátodos y en particular de *Turbatrix aceti*. Se consultaron todos los medios de crecimiento para las especies de micro nematodos más estudiadas como *C. elegans*, *Panagrellus redivivus*, *Turbatrix aceti*, etc. Lo anterior con la finalidad de identificar los ingredientes más utilizados y elaborar una propuesta de medio de crecimiento para *T. aceti* para fines de acuicultura. Debido a que en los medios líquidos los nemátodos son más sencillos de separar, se prefirió este tipo de medio en lugar de los medios sólidos, y debido a que la especie de interés, *T. aceti* está bien adaptada a medios con pH bajo, lo cual limita la

presencia de especies contaminantes en los cultivos, se decidió seleccionar medios que incluyen el ácido acético en su composición. LA formulación de la Dieta Artificial se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Ingredientes utilizados en la formulación de la Dieta Base (DB) y la Dieta Artificial (DA).

Ingredientes	DB (%)	DA (%)
Proteína aislada de soya		1
Harina de sangre		0.05
Levadura		1
Aceite canola		2
Colesterol		0.001
Lecitina de soya		1
Mezcla Vitaminas y Minerales		0.01
Vinagre de caña	50	94.94
Agua destilada	15	0
Extracto de manzana	35	
Total	100	100
pH 3.5		
P=Vol (g y mL)		

Experimento I. Evaluación de la densidad de Turbatrix aceti en una Dieta Artificial (DA) y compararlo con su Dieta Base (DB).

Preparación de la DA: Para preparar 1 L de medio DA se utilizó un vaso de precipitados de 1 L donde se vertieron 500 mL de vinagre; el vaso se colocó sobre una parrilla de agitación donde se agregaron los ingredientes previamente pulverizados (10 g de Proteína Hidrolizada de soya + 0.5 g de Harina de sangre + 10 g de levadura + 0.1 g/ mL premezcla vitaminas y minerales); una vez que los ingredientes estuvieron bien mezclados se preparó una Emulsión (0.01 g Colesterol + 10 mL Lecitina de soya + 20 mL Aceite de canola) ; para preparar dicha emulsión se colocó en un vaso el aceite con la lecitina y el colesterol se homogenizó con ayuda de un emulsificador. Una vez obtenida la emulsión se mezcló con el resto del medio en un homogeneizador de alto torque.

La DA fue evaluada a diferentes concentraciones diluyendo con ácido acético (AAc) (100DA %, 75DA/25AAc %, 50 %DA/50%AAc, 25%DA/75 %AAc, 12.5 %DA/87.5 %AAc, 6.25%DA/ 93.75 %AAc, 3.13 %DA/ 96.87 %AAc, 1.6 %DA /98.4 %AAc) y contrastado con el Medio Base al 100% (Tabla 1). Se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento. Para cada repetición se utilizaron tubos de ensayo de 10 mL, con 5 mL de medio (a las diferentes concentraciones) en los que se inocularon 2 mL de concentrado de

nemátodos a una densidad de 7,600 nemátodos/ mL, siendo 15,200 nemátodos / 2mL en cada tubo o repetición. El concentrado de nemátodos se obtuvo a partir de un cultivo en Medio Base (Vinagre de caña 50%+ extracto de manzana natural 35% + agua destilada 15%) el cual fue filtrado con mallas de 100 y 50 micras. El filtrado con nemátodos fue vertido en un vaso con 100 ml de vinagre de caña el cual fue colocado en un agitador y posteriormente se realizó un muestreo para definir la densidad del inóculo y posteriormente agregar 2 ml por repetición.

TABLA 2. Tratamientos con DA a diferentes concentraciones y el Medio Base.

Tratamientos	Para un volumen de 5 ml / repetición
100 % DA	5 ml DA
75% DA + 25% vinagre	3.75 ml DA + 1.25 ml vinagre
50 % DA + 50 % vinagre	2.5 ml DA + 2.5 ml vinagre
25 % DA + 75% Vinagre	1.25 ml DA + 3.72 ml vinagre
12.2 % DA + 87.5 % Vinagre	0.625 ml DA + 4.375 ml vinagre
6.25 % DA + 93.75 % vinagre	0.312 ml DA + 4.687 ml vinagre
3.13 % DA + 96.87 % vinagre	0.156 ml DA + 4.843 ml vinagre
1.6 % DA + 4 % Vinagre	0.066 ml DA + 4.934 ml vinagre
100% Medio Base	2.5 ml Vinagre+1.75 ml Extracto manzana + 0.75 ml agua destilada.

Se realizaron muestreos de cada uno de los 7 tratamientos y sus 5 repeticiones una vez por semana durante 6 semanas. El procedimiento de conteo del onóculo inicial así como del resto de los muestreos consistió en:1) Tomar un tubo de cada repetición y agitarlo durante unos segundos; 2) Tomar 5 laminillas y colocar 3 muestras de 5 microlitros en cada una. 3)

Observar las muestras obtenidas bajo en microscopio a 4 x. 4) Registrar el número de nemátodos de cada muestra en una hoja de cálculo para ser analizados posteriormente.

Los resultados fueron analizados con una prueba Kruskal-Wallis. y el Método Dunns.

Experimento 2. Evaluación de la densidad de Turbatrix aceti en una DA a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30, y 35 °C).

Para realizar la evaluación del crecimiento de la población de *T. aceti* a diferentes temperaturas se utilizó la DA al 100% probada en el primer experimento en recipientes de 1 L por repetición y las temperaturas fueron de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C y 35°C. Cada temperatura se evaluó por triplicado. El pH se calibró a 3-3.5 para todos los tratamientos. La aireación fue suministrada por medio de mangueras aireadoras y utilizando bombas de aire ELITE 802 y BOYU AQUARIUM S-9902. La DA fue preparada y colocada en los recipientes a diferentes temperaturas. Los tratamientos de 15°C y 20°C fueron colocados en cajas plásticas con agua dentro de dos incubadoras y los de 25°C, 30°C y 35°C en cajas plásticas con agua y calentadores sumergibles de cristal de SGH-50. Una vez colocados los recipientes a las diferentes temperaturas, se colocaron 500 mL de DA + el inóculo de 100 mL con concentrado de nemátodos a una densidad de 710,000 nemátodos/ mL / repetición.

La duración de dicho experimento fue de 4 semanas. Una vez por semana se realizó un conteo de nemátodos / ml. El procedimiento de conteo por repetición se detalla a continuación.

- 1) Se tomó la repetición (recipiente 1 l) y se colocó en una parrilla de agitación por 5 minutos, posteriormente se tomó una muestra de 5 microlitros y se colocó en una laminilla a la cual se le colocó un cubre objetos. Este procedimiento se repitió para 6 repeticiones/ repetición (3) y todas las muestras se colocaron sobre hielo molido para inmovilizar a los nematodos y poder realizar el conteo en el microscopio.
- 2) Se observaron las laminillas al microscopio (Axioscop 40) a 4 x para realizar el conteo por 5 microlitros el cual fué registrado en una hoja de cálculo.
- 3) Se realizó el mismo procedimiento para cada repetición por tratamiento y un total de 4 muestreos para todo el experimento.

Al finalizar los 4 muestreos y una vez obtenida la hoja de cálculo, se procedió a calcular el número de nemátodos por mL por tratamiento (temperaturas).

Los resultados fueron analizados por medio de una ANOVA de 1 VIA y una prueba de Tukey.

Experimento 3. Comparación de las densidades de Turbatrix aceti en una DA con diferentes fuentes de proteína a diferentes proporciones, antioxidantes y concentraciones.

En base a los mejores resultados obtenidos en los dos experimentos anteriores, se planteó observar el efecto del tipo y porcentaje de proteína en el crecimiento de la *T. aceti*, y esto se logró evaluando cuatro tratamientos: DA (1% proteína aislada de soya), DC (0.5% Proteína soya+0.5% Proteína de maíz + harina de sangre 0.05%+0.1 astaxantina), DC 2 (1% P. Aislada de soya+1% Proteína de maíz, 0.1% harina de sangre y 0.1% astaxantina), DC 50 (Diluida al 50%), y DC 2 -50 (Diluida al 50%), la formulación de los tratamientos se detalla en la tabla 2.

Tabla 3. Formulación de los diferentes tratamientos para evaluar el efecto del porcentaje y tipo de proteína, antioxidantes y porcentaje de dilución de una DA para *Turbatrix aceti*.

Ingredientes	Dieta				
	DA	DC	DC 2	DC 50	DC 2-50
Prot. Aisl. Soya	1	0.5	1	0.5	1
Conc. Prot Maíz	0	0.5	1	0.5	1
Harina Sangre	0.05	0.05	0.1	0.05	0.1
Lev.Cerveza	1	0.5	0.5	0.5	0.5
Aceite Canola	2	2	2	2	2
Colesterol	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Lecitina Soya	1	1	1	1	1
Vit.Mix	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Min.Mix	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Astaxantina	0	0.1	0.1	0.1	0.1
Vinagre	94.93	95.33	94.38	47.66	47.19
Agua	0	0	0	47.66	47.19
extracto de manzana					
Total	100	100	100	100	100
25oC					
pH 3.5					
p=V (gr. y ml)					
Volumen = 100 ml.					

Experimento 4. Evaluación de la densidad de Turbatrix aceti con una DA con aceite y sin aceite.

En base a los resultados en los experimentos previos con la DA, y a un óptimo de temperatura de crecimiento a volúmenes de 10 mL, se diseñó un experimento para evaluar el crecimiento a escala (600 mL) de la población de *T. aceti*. Para dicho experimento se utilizó la Dieta Artificial Con Aceite (DACA), Dieta Artificial Sin Aceite (DASA) y Dieta Base (DB). El experimento fue realizado con apoyo de la alumna de Licenciatura Esther Coss, asesorada por la Biól. Alejandra Ahumada y el Dr. Carlos Martínez.

El Diseño Experimental consistió en tres tratamientos (DACA, DASA y DB) cada uno con seis repeticiones consistentes en contenedores de 1 litro a los cuales les fue colocado 500 ml de medio + 100 ml de inóculo de nemátodos a una densidad de 8.700 nemátodos / mL a los cuales se les colocó una manguera aireadora y una tapa. Cada contenedor fue colocado dentro de un contenedor de 1 metro/ 60 cm de altura en baño maría y con dos calentadores sumergibles para mantener una temperatura de 26 °C y fotoperiodo de 12/12. El monitoreo de crecimiento de la población de *T. aceti* se realizó de la misma forma que para los experimentos previos. La duración del experimento fue de 30 días.

Los datos se registraron en una hoja de cálculo y fueron analizados con el programa Sigma Plot 12. Se realizó una ANOVA de 1 vía y una prueba de Tukey.

Experimento 5. Evaluación del consumo de Turbatrrix aceti en larvas de Chirostoma estor.

A partir de un cultivo estable de *T. aceti* se realizó la evaluación del consumo en larvas de *Chirostoma estor* alimentadas con *T. aceti* cultivados en DA los cuales fueron comparados con el alimento vivo convencional constituido por Rotíferos (*B. plicatilis*). El experimento tuvo una duración de 15 días partir del día 10 post eclosión de larvas de pez blanco. El diseño experimental consistió de 2 tratamientos:

- 1) 100% rotíferos (Control)
- 2) 100 % nemátodos

Se utilizaron 100 larvas de 10 dpe para ser alimentadas con nemátodos y 50 larvas para ser alimentadas con rotíferos. Cada repetición tuvo 50 larvas para un total de 150 larvas. 3 tanques cilíndricos de 2 L con un fondo de malla de 10 µm, sumergidos en otro tanque rectangular con capacidad para de 150 L el cual estuvo conectado a un sistema de recirculación con filtro biológico de columna y sedimentador. Los parámetros de calidad de agua fueron los siguientes: La temperatura fue de 21°C, la salinidad de 5 y el oxígeno disuelto de 4 mg/l. con un fotoperiodo de 12L/12/O. Amonio (NH₃-NH₄), Nitritos (NO₂) y pH de 7±0.5.

Para la alimentación se obtuvieron filtrados de rotífero de la planta de producción de alimentos vivos (Laboratorio de acuicultura, IIAF) y los nemátodos fueron cultivados en un laboratorio para cultivos vivos exclusivo para mantener el stock de la especie *T. aceti*. y fueron filtrados siguiendo mismo Protocolo para la Separación de Nemátodos de los experimentos anteriores y previo a ser incorporados en los diferentes tratamientos. Las densidades definida para el experimento fue de 30 individuos/ml.

Los factores que fueron evaluados son:

- 1) Supervivencia: Conteo diario de la mortalidad y conteo al final del experimento.
- 2) Contenido del intestino: Muestra de 5 larvas/repetición y análisis del contenido intestinal. Esto se logró realizando un conteo de nemátodos por intestino de cada una de las 5 larvas, con un Microscopio Axioscop 40 (Carl Zeiss) y una aguja de disección.
- 3) Crecimiento: Longitud de una muestra de 5 larvas/repetición al principio (Día 10), y a final del experimento.

IV. RESULTADOS

Experimento 1. Evaluación de la densidad de Turbatrix aceti en una Dieta Artificial (DA) y compararlo con su Dieta Base (DB).

En un volumen pequeño de 5 ml para medir el crecimiento de la población del nemátodo *T. aceti*, La prueba Kruskal-Wallis aplicada a diferentes % de DA muestra diferencia significativa entre tratamientos con un valor de $P < 0.001$ y no existe diferencia entre los tratamientos de 100% DA, 75 % DA y DB.

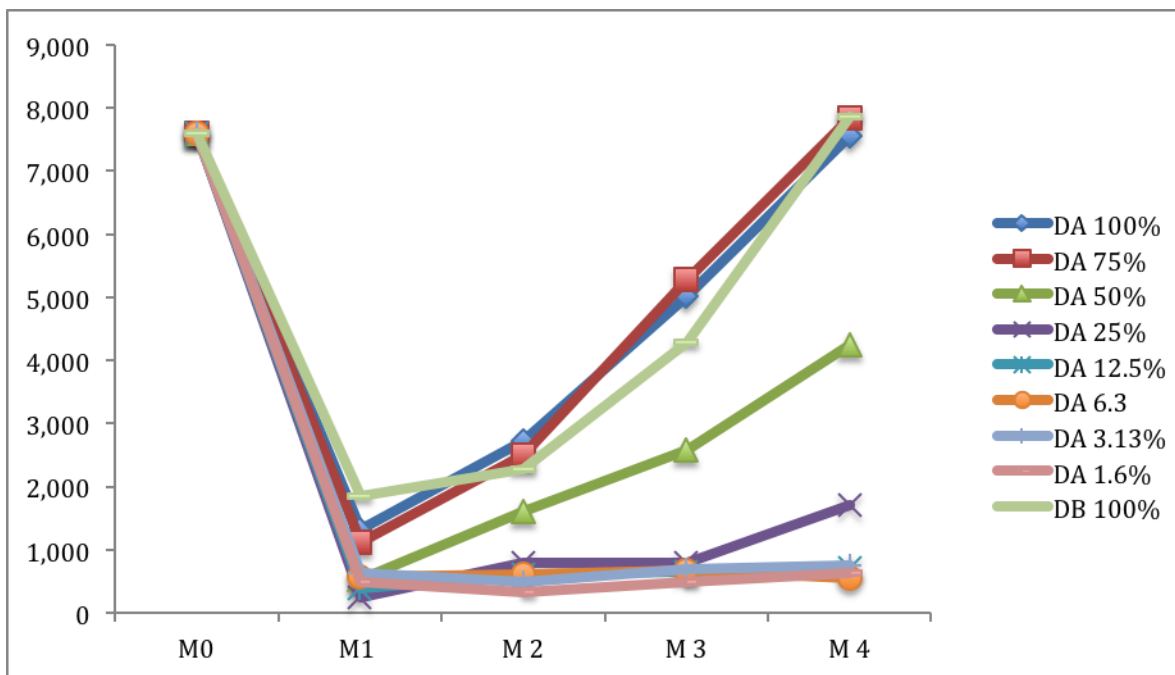


FIGURA 1. Crecimiento de *T. aceti* (Y=Individuos/ml) en un DA a diferentes concentraciones durante 4 semanas (X) comparado con la Dieta Base (DB). En el cuadro se representan las diferentes concentraciones de DA y el control MB.

DA= 50 % Vinagre de caña, 1 % Proteína aislada de soya, 500 microgramos/mL harina de sangre, 1% Levadura, 10 microgramos/mL de colesterol, 2% aceite de canola y 1% Lecitina.

MB= Medio base, vinagre de caña, jugo de manzana y agua destilada.

La prueba Kruskal-Wallis aplicada al crecimiento de *T. aceti* en diferentes concentraciones de DA muestra diferencia significativa entre tratamientos con un valor de $P < 0.001$ por lo que no existe diferencia significativa entre los tratamientos de 100% DA, 75 % DA y MB.

Experimento 2. Evaluación de la densidad de Turbatrix aceti en una DA a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30, y 35 °C).

El crecimiento de *T. aceti* en la Dieta Artificial (DA) y en un intervalo de temperaturas (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, y 35 °C) y un periodo de 21 días presentó diferencias significativas entre tratamientos, y no presentando diferencias entre 20 y 25 °C con una densidad de 10,000 nematodos / ml. (Fig. 4).

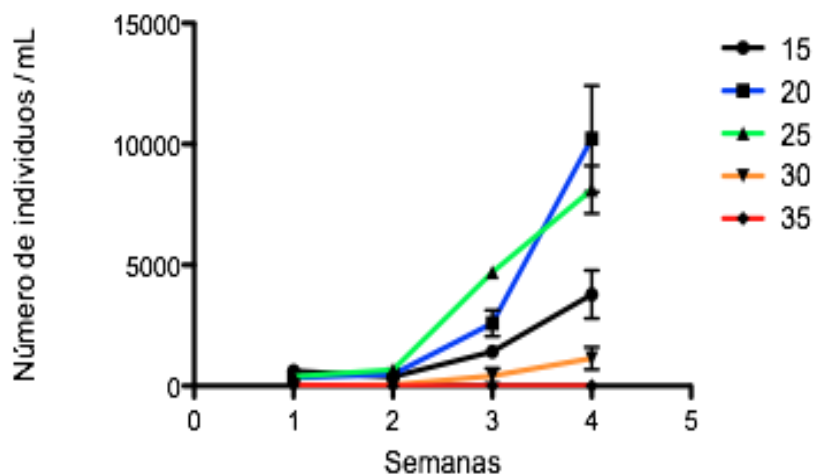


FIGURA 2. Densidades finales de *Turbatrix aceti* en un DA a diferentes Temperaturas durante 4 semanas. Los números a la derecha son las temperaturas evaluadas en °C

Experimento III. Comparación de las densidades de Turbatrix aceti en una DA con diferentes fuentes de proteína a diferentes proporciones, antioxidantes y concentraciones.

La densidad de la población de nemátodos *T. aceti* en la DA alcanzó los 30,000 nemátodos /mililitro a partir del día 21 pos inoculación y presentando diferencia significativa con los otros tratamientos:DC, DC2 y DC 50. (Fig. 6)

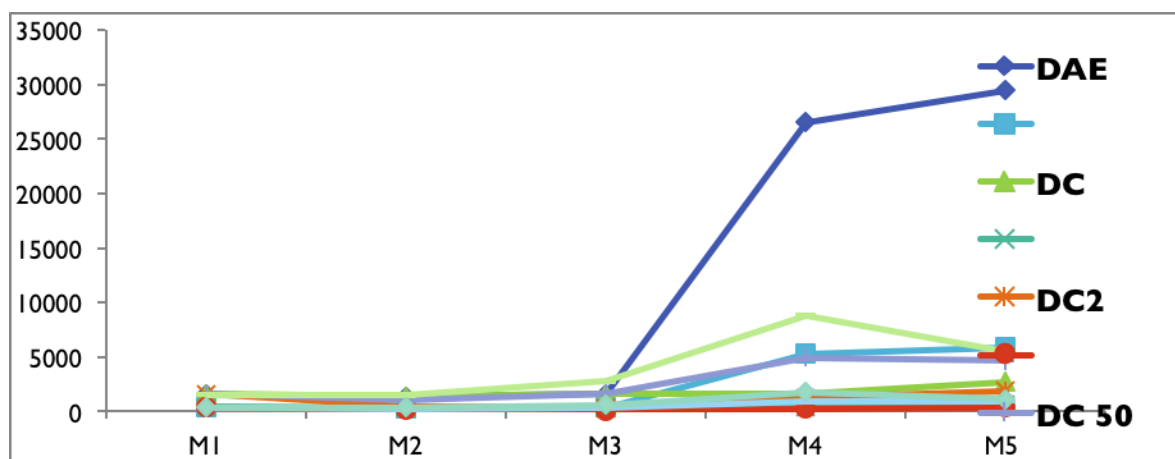


FIGURA 3. Crecimiento de *T. aceti* (Individuos/mL) en DA, Dieta Control (DC), Dieta Control con dos fuentes de proteína (DC x 2), Dieta Control al 50% y Dieta Control con dos fuentes de proteína al 50 %. (P=0.001) y el mejor tratamiento fue DA.

Experimento IV. Evaluación de la densidad de *Turbatrix aceti* con una DA con aceite y sin aceite.

Los resultados arrojados en este experimento para cuantificar el crecimiento a escala de la población de *T. aceti* muestran que la DA sin aceite presenta el mejor crecimiento al día 21 pos inoculación con 30,000 nemátodos por ml o 30,000,000 por litro. (Fig. 7)

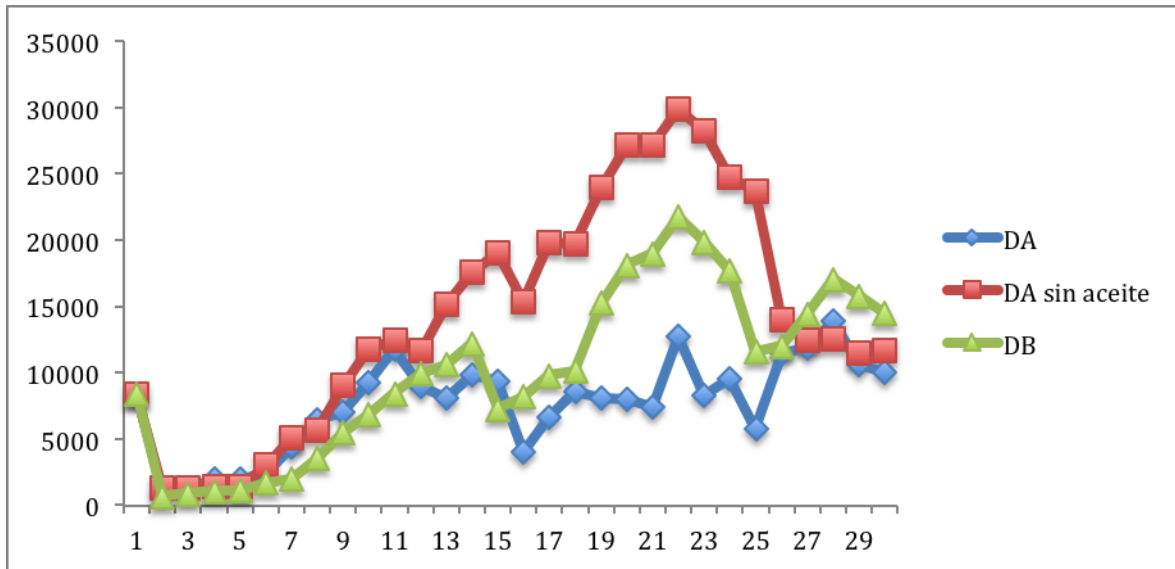


FIGURA 4. Crecimiento de la población de *T. aceti* utilizando tres Dietas: DA, DA sin aceite y DB. El mejor crecimiento se presentó en la DA sin aceite al día 21 pos inoculación presentando diferencia significativa respecto a los otros tratamientos (P = 0,032).

Experimento V. Evaluación del consumo de *Turbatrix aceti* en larvas de pez blanco, *Chirostoma estor*.

Los resultados de supervivencia en un periodo de 15 días en larvas de 10 dpe de *Chirostoma estor* las cuales se alimentaron con *T. aceti* y *B. plicatilis* se muestran en la Tabla 8.

Tabla 4. Supervivencia en larvas de *C. estor* de 10 dpe alimentadas con el nemátodo *T. aceti* y un control con *Brachionus plicatilis*.

Fecha	Nemátodos R1	Nemátodos R2	Rotíferos	Promedio R1 y R2
27	50	50	50	50
28	2	6	2	4
29	11	9	3	10
30	7	6	5	7.5
1	9	8	5	8.5
2	4	6	5	5
3	2	0	6	1
4	1	0	3	0.5
5	0	2	2	1
6	0	0	2	0
7	0	0	1	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
Larvas al final	13	13	16	13

Aunado a lo anterior se realizó un muestreo aleatorio al final del experimento para conocer el contenido del intestino de 6 larvas alimentadas con nematodos así como su longitud (Fig. 8 y 9) . Se tomó una muestra de seis larvas de las dos repeticiones con nematodos, las cuales fueron enfriadas y posteriormente se extrajo el intestino (con agujas entomológicas) para realizar el conteo de nematodos bajo el microscopio (Tabla 9)

Tabla 9. Muestreo de 5 larvas para conteo de nemátodos *T. aceti* en el intestino y la longitud de cada larva al finalizar el experimento de 14 días.(Tabla 5)

Tabla 5. Muestreo de 5 larvas para conteo de nemátodos *Turbatrix aceti* en el intestino y la longitud de cada larva al finalizar el experimento de 14 días.

No. de larva	1	2	3	4	6
No. de nemátodos/larva	110	70	50	47	100
Longitud (cm)	0.8	0.6	0.6	0.7	1.0

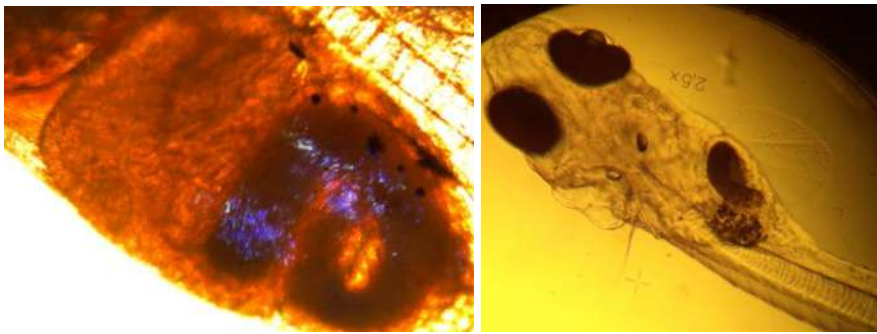


Fig. 5. Larva de 10 dpe de *Chirostoma estor* con el intestino ocupado por nemátodos *Turbatrix aceti* al finalizar el experimento de 30 dpe.

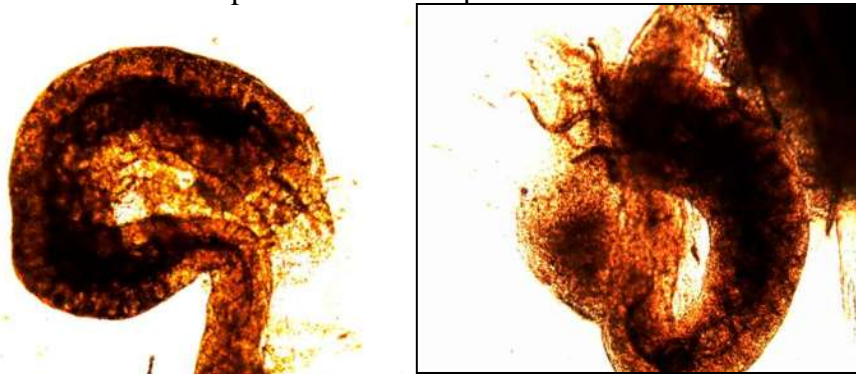


Fig. 6 Intestino extraído de la larva de *Chirostoma estor* de 10 dpe donde se observan a los nemátodos *T. Aceti* semi digeridos, con lo que se comprueba la capacidad quitinolítica de las enzimas intestinales

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se aplicó un *Protocolo de Separación para Nemátodos* a partir de una serie de filtraciones con mallas a diferentes tamaños (100, 50 y 10 micras) con la finalidad de tener un método para separar por tamaños los nemátodos deseados según la etapa larvaria a la que se ofrecerán. Esto coincide con los resultados de Buck *et al* (2015) quien reporta que el mejor método de separación fue el que se obtuvo con filtración a 20 micras.

Algunos autores que han preparado dietas de crecimiento para nemátodos, como en *Panagrellus redivivus* se han incorporado bacterias (Lower *et al.*,1970), Moens y Vincx., 1998), levaduras (Rottmann *et al.* 1991; Ricci *et al.* 2003; Schlechtriem *et al.*, 2004 y Rottmann, 1988), *Spirulina sp.* (Lara *et al.*,2007). En este proyecto se utilizaron levaduras a una proporción de 1%, que parece ser adecuado por los resultados obtenidos.

El intervalo de temperaturas óptimo que se encontró (20 y 25°C), resulta cercano a lo reportado (Winkler y Pramer, 1961) para *P. redivivus* de 20°C, Ricci *et al.* (2003) a 25°C, Kumlu *et al.* (1994, 1998) a 22°C, y Rouse *et al.* (1992) a 20–24°C. Para sostener un buen crecimiento de la población en general de nemátodos de vida libre, la temperatura debe ser mantenida en el intervalo de temperaturas ya mencionadas, entre 20°C y 25°C.

Durante el experimento para evaluar el crecimiento *a escala* de la población de *T. aceti* en una Dieta Artificial Con Aceite (DACA), dieta artificial sin aceite (DASA), y dieta base de manzana(DB), el mejor resultado lo arrojó la DASA con una producción de 30,000 nemátodos por ml (30 millones de nemátodos/litro) al día 21 pos inoculación y superando al medio óptimo reportado por Buck *et al* (2015) quien lo reporta al día 70 pos inoculación.

En el experimento final relativo a la evaluación del consumo y supervivencia de larvas de *Chirostoma estor* alimentadas con *Turbatrix aceti*, se encontraron 75 nemátodos de *T. aceti* al evaluar el contenido intestinal. Este es el primer reporte de consumo de nemátodos *T. aceti* en *Chirostoma estor*.

VI. CONCLUSIONES

Como lo han reportado diversos autores en Bruggeman (2013) los nemátodos pueden ser cultivados en diversos medios, recientemente Buck et. al. (2015) analizan 11 medios diferentes para el crecimiento de *Turbatrix aceti*, donde encuentra que el crecimiento en uno de los medios líquidos es el óptimo con densidades de 30×10^6 de nemátodos por litro, siendo también muy rentable en términos económicos. En el presente trabajo se encontraron resultados similares a los reportados por este autor, aunque el crecimiento máximo de la población se presentó antes de lo reportado por Buck et al (2015) pero a los 21 días pos inoculación contrario a este autor que los encontro a los 70 días, siendo DASA el mejor medio diseñado actualmente para el cultivo de *T. Aceti* tanto en densidad como en tiempo de cultivo pues se alcanza en solo 1/3 del tiempo alcanzado por otros autores.

La temperatura óptima para el crecimiento de *T. aceti* en la Dieta Artificial propuesta fue 20°C. Y por lo encontrado por varios autores y este trabajo la temperatura de los nemátodos utilizados en acuicultura se encuentra en un intervalo de cultivo de entre 20°C y 25°C.

Un aspecto fundamental en el cultivo de nemátodos es que el método de separación de los mismos así en este trabajo se utilizó el Protocolo para la Separación de nemátodos reportado por Ahumada y Martínez (2015 Com. Pers) y es particularmente similar al reportado también Buck (2015) y menos costoso que los reportados por Brüggemann et al (2013).

T. aceti es el único nemátodo de vida libre capaz de suspenderse en la columna de agua y presenta tamaños diversos que pueden ser ofrecidos a diferentes etapas larvarias o de vida de peces y crustáceos. En el experimento con larvas de pez blanco (*C. estor*) se encontraron intestinos con nemátodos, desde el día 10 al día 24 pos eclosión, siendo este el primer reporte para la especie en términos de consumo de nemátodos y su digestión sin ningún problema, lo que comprueba que estos peces poseen quitinasa, como lo reporta Pools (et al, in Press).

Los resultados durante el presente experimento mostraron el potencial del nemátodo *T. aceti* para ser implementado en los esquemas de larvicultura del pez blanco y otras especies, que posean dificultad para aceptar alimentos vivos o artificiales.

El potencial de la DASA para la producción a escala comercial del nematodo *T. aceti* mostrado en el presente trabajo, es una referencia para la aplicación de este medio a mayor escala 20 Litros, 100 Litros, etc., el método de separación y limpieza implementado resulta ser sencillo y rápido por lo cual se sienta la base tecnológica para su aplicación en los esquemas de producción de alimentos vivos en acuicultura.

Los resultados de crecimiento de *T. aceti*, así como su consumo en larvas de *C. estor*, demuestra su potencial como alimento vivo complementario para la alimentación larvaria Este es el primer reporte del consumo de nemátodos por *Chirostoma estor* en sistemas de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, U.S.A.
- Bariere, A.M.A. Felix. 2006. Isolation of *Caenorhabditis elegans* and related nematodes. Accessed Dec. 19, 2010.
http://www.wormbook.org/chapters/www_nematodeisolation/nematodeisolation.html.
- Biedenbach, J.M., Smith, L.L., Thomsen, T.K., Lawrence, A.L. 1989. Use of the nematode *Panagrellus redivivus* as an *Artemia* replacement in a larval penaeid diet. *Journal of the World Aquaculture Society*. 20, 61-71.
- Brüggemann, J. 2012. Nematodes as live food in larviculture: A Review. *Journal of the World Aquaculture Society*. 43, 739-76.
- Bruun, A. F. 1949. The use of nematodes as food for larval fish. *Journal du Conseil/Conseil Permanent International Pour l'Exploration de la Mer*. 16, 96-99.
- Campos, A. 2000. Comparación del crecimiento de tres especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae), en cultivo experimental dentro de sistemas parciales de recirculación de agua. Tesis de Maestría. U.M.S.N.H. Morelia, Michoacán. 70.
- Conceição, L. E. C., Ozorio, R., Suurd, E. A., Verreth, J. A. J. 1998. Amino acid profiles and amino acid utilization in larval African catfish (*Clarias gariepinus*): effects of ontogeny and temperature. *Fish Physiology and Biochemistry*. 19, 43-57.
- Conceição, L. E. C., Grasdalen, H., Rønnestad, I. 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. *Aquaculture*. 227, 221-232.
- de Lara, R., Castro, T., Castro, J., Castro, G. 2007. Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina* sp. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 42, 29-36.
- M. Dworkin., Falkow, S. 2006. *The prokaryotes: A Handbook on the biology of bacteria*.
- Fisher CML., Fletcher D.J. 1995. Novel feeds for use in aquaculture. Patent: international application number PCT/GB95/00021.
- Focken, U., Schlechtriem, C., Wuthenau, M., Garcia-Ortega, A., Puello-Cruz, A., Becker, K. 2006. *Panagrellus redivivus* mass produced on solid media as live food for *Litopenaeus vannamei* larvae. *Aquaculture Research*. 31, 1429-1436.

- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L. E. C., Izquierdo, M. 2013. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*, 5, s1, 26-58.
- Hirata, H. 1980. An attempt to apply an experimental microcosm for the mass culture of marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Kagoshima University*. 23, 163-172.
- Hoffer, R., Nassir-Uddin, A. 1985. Digestive processes during the development of the roach, *Rutilus rutilus*, L. *J. Fish. Biol.*, 26, 683-689.
- Hofsten, A. V., Kahan, D., Katznelson, R., Bar-El, T. 1983. Digestion of free-living nematodes fed to fish. *Journal of Fish Biology*. 23, 419-428.
- Hofsten, A.V., Kahan, D., Katznelson, R., Bar-El, T. 2006. Digestion of free-living nematodes fed to fish, *Journal of Fish Biology*. 23, 419-428.
- Hooper, D. J. 1986. Extraction of free-living stages from soil. Pages 5-30 in J. F. Southey, editor. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK.
- Hutzel, P. A., Krusberg, L. R. 1982. Fatty acid composition of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 73B, 517 – 520.
- Ivleva, I. V. 1969. *Mass cultivation of invertebrates. Biology and methods*. Academy of Science of the U.S.S.R., Moscow, Russia.
- Izquierdo, M. S. 1996. Review article: essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*. 2,183-191.
- Jones, A., Houde, E. D. 1986. Mass rearing of fish fry for aquaculture. In: Bilio, M. Rosenthal, H. y C. F. Sindermann (Eds.), *Realism in Aquaculture: Achievements, constraints and perspectives*. European Aquaculture society, Bredene. 351-373.
- Kahan, D., Appel, Z. 1975. The value of *Panagrellus* sp. (Nematoda) as food for fish. Pages 243–253 in 10th European Symposium in Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17–23, 1975, volume I.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. W., Gertler, A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 203-209.
- Koven, W., Barr, Hadas, Y., E., Ben-Atia, I., Chen, Y., Weiss, R., Tandler, A. 1999. The potential of liposomes as a nutrient supplement in first-feeding marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*. 5, 251-256.
- Kumlu, M., Le Vay, J., Jones, D. A. 1994. Recent advances in the development of microencapsulated diets for shrimp larval culture. In H. S. Kas and A. A. Hincal, editors. *Minutes of the 9th International Symposium on Microencapsulation*, Sept. 13 – 15, 1993, Ankara, Turkey, Editions des Santé, Paris, Europe.
- Kumlu, M. and D. J. Fletcher. 1997. The nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live feed for larval *Penaeus indicus*. *Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh*, 49, 12–18.

- Kumlu, M., D. J. Fletcher, and C. M. Fisher. 1998. Larval pigmentation, survival, and growth of *Penaeus indicus* fed the nematode *Panagrellus redivivus* enriched with astaxanthin and various lipids. *Aquaculture Nutrition*, 4, 193-200.
- Lavens, P., Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361. FAO, Rome, Italy.
- Lavens, P., Sorgeloos, P. 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cyst for aquaculture 181,397-403.
- Leger, P., Sorgeloos. 1992. Optimized feeding regimes in shrimp hatcheries. Pages 225–244. *Marine shrimp culture: principles and practices*. Elsevier Science, New York, New York, USA.
- Lower, W. R., J. D. Willett, and E. L. Hansen. 1970. Selection for adaptation to increased temperatures in free-living nematodes. II. Some lipid differences in *Panagrellus redivivus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 34(2):473–479.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 147:245–255.
- Martínez Palacios, C. A., Ríos-Durán, M. G., Campos Mendoza, A., Toledo Cuevas, M., Ross, L. G. 2002. Avances en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México*.
- Martínez-Palacios CA, Ríos-Duran MG, Fonseca-Madrigal J, Toledo-Cuevas M, Sotelo López A, Ross LG. 2008. Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880. *Aquacult Res* 39:738–747.
- Merriam Webster Dictionary, On line. 2013.
- Mohney, L. L., D. V. Lightner, R. R. Williams, and M. Bauerlein. 1990. Bioencapsulation of therapeutic quantities of the antibacterial romet-30 in nauplii of the brine shrimp *Artemia* and in the nematode *Panagrellus redivivus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 21(3):186 – 191.
- Moens, T. and M. Vincx. 1998. On the cultivation of free-living marine and estuarine nematodes. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 52(2):115–139.
- Morelos, M. G., Segura, V., Chacón, A. 1994. Desarrollo embrionario del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* (Jordan 1873; Pisces:Atherinidae). *Zoología Informa*, 27(8):22-46.
- Olvera-Novoa, M.A., Martínez-Palacios, C., y Real de León, E.1993. Manual de Técnicas para el laboratorio de nutrición de peces y crustáceos, FAO, México, 104 p.
- Oseguera, L., 1990. Caracterización morfológica de estadios embrionarios y juveniles de *Chirostoma grandocule* Steindachner (1896) y verificación del híbrido con *Chirostoma attenuatum* Meek (1902) del lago de Pátzcuaro, Mich., México. Tesis Profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Escuela de Biología. Morelia, Michoacán. 65 p.

- Peters, A. 2013. Application and commercialization of nematodes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:6181–6188.
- Peters, B. G. 1928. On the bionomics of the Vinegar Eelworm, *Journal of Helminthology*, Vol. 6, Issue 01, 1-38.
- Pohls-Ramírez, P. 2010. Determinación de la expresión genica y actividad enzimática de la quitinasa en el pez blanco del lago de Pátzcuaro (*Menidia estor*, Jordan 1880), Tesis de Maestría, UNAM. 82 p.
- Radwin, I. A. and A. B. Rouse. 1990. Yield characteristics of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* in different culture media. *Progressive Fish Culturist* 52:237 – 240.
- Radwin, I. A. 1988. Effect of culture media on yield and chemical composition if the living nematode *Panagrellus redivivus*. Master's thesis, Auburn University, Auburn, Alabama, USA.
- Ricci, M., A. P. Fifi, A. Ragni, C. Schlechtriem, and U. Focken. 2003. Development of a low-cost technology for mass production of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live food for first feeding fish larvae. *Applied Microbiology Biotechnology* 60:556–559.
- RNP, 2008, Registro Nacional de Pesca, México.
- Rosas, M. 1970. Pescado blanco (*Chirostoma estor*), su fomento y cultivo en México. Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras, Comisión Nacional Consultiva de Pesca. México. 79 p.
- Rojas, P., Mares, G. 1988. Cultivo de pescado blanco (*Chirostoma estor*). Instituto Nacional de la Pesca. Centro Regional de Investigación Pesquera. Informe de labores. Pátzcuaro, Mich. 98 p.
- Rosas-Monge, C. 1994. Cultivo experimental de crías de pez blanco. Tesis Profesional. U.M.S.N.H. Morelia. 169 p.
- Rothstein, M., Cook, E. 1966. Nematode Biochemistry-VI. Conditions for axenic culture of *Turbatrix aceti*, *Panagrellus redivivus*, *Rhabditis anomala* and *Caenorhabditis briggsae*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 17: 683-692.
- Rothstein, M. 1974. Practical methods for the axenic culture of the free-living nematodes *Turbatrix aceti* and *Caenorhabditis briggsae*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B: Comparative Biochemistry, Vol. 49, Issue 4, 669-678.
- Rottmann, R. W. 1988. Microworm culture for aquarium fish producers. IFAS Fact Sheet FA-9, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.
- Rottmann, R. W., J. V. Shireman, and E. P. Lincoln. 1991. Comparison of three live foods and two dry diets for intensive culture of grass carp and bighead carp larvae. *Aquaculture* 96:269–280.
- Rouse, R., J. V. Shireman, y E. P. Lincoln. 1992. Enhancement of the fatty acid composition of the nematode. *Aquaculture* 96(3–4):169–280.
- Santiago, C. B., A. C. Gonzal, M. Ricci, and S. Harpaz. 2003. Response of bighead carp *Aristichthys nobilis* and Asian catfish *Clarias macrocephalus* larvae to free-living nematode *Panagrellus redivivus* as alternative feed. *Journal of Applied Ichthyology* 19(4):239 – 243.

- Sautter, J., H. Kaiser, U. Focken, y K. Becker. 2007. *Panagrellus redivivus* (Linne) as a live food organism in the early rearing of the catfish *Synodontis petricola* (Matthes). *Aquaculture Research* 38(6):653–659.
- Schlechtriem, C., M. Ricci, U. Focken, and K. Becker. 2004a. Mass produced nematodes *Panagrellus redivivus* as live food for rearing carp larvae: preliminary results. *Aquaculture Research* 35(6):547–551.
- Schlechtriem, C., D. R. Tocher, J. R. K. Becker. 2004b. Incorporation and of fatty acids by desaturation and elongation in the nematode, *Panagrellus redivivus*. *Nematology* 6(6):783 – 795.
- Schlechtriem, C., U. Focken, and K. Becker. 2004c. Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. *Aquatic Ecology* 38(1):93–100.
- Schlechtriem, C., M. Ricci, U. Focken, and K. Becker. 2004d. The suitability of the free-living nema- tode *Panagrellus redivivus* as live food for first- feeding fish larvae. *Journal of Applied Ichthyology* 20(3):161 – 168.
- Schlechtriem, C., U. Focken, and K. Becker. 2005. Digestion and assimilation of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* fed to first feeding coregonid larvae: evidence from histological and isotopic studies. *Jour- nal of the World Aquaculture Society* 36(1):24–31.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.*, 119: 471-486
- Solórzano, A. 1963. Algunos aspectos biológicos del pescado blanco del lago de Pátzcuaro, Mich. (*Chirostoma estor* Jordan, 1879). Instituto Nacional de Investigaciones Biológico-Pesqueras. Dirección General de Pesca e Industrias Conexas. México. 15 p.
- Sorgeloos, P. and G. Persoone. 1975. Technical improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans. II. Hatching and culturing the brine shrimp, *Artemia salina* L. *Aquaculture* 6:303 – 317.
- Thesaurus Dictionary, On line, 2013.
- Tonheim, S.K., Koven, B, Ronnestad, I. 2000. Enrichment of *Artemia* With free methionine. *Aquaculture* 190, 223—235
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in larval marine fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:152–161.
- Watanabe, T., Kiron, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. Review. *Aquaculture*, 124: 223-251.
- Watts, J. L. and J. Browse. 2002. Genetic dissection of poly unsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sci- ence of the United States of America* 99:5854–5859.
- Wilkenfeld, J. S., A. L. Lawrence, and F. D. Kuban. 1984. Survival, metamorphosis and growth of penaeid shrimp larvae reared on a variety of algal and animal foods. *Journal of the World Mariculture Society* 15:31 – 49.
- Winkler, E. J. and D. Pramer. 1961. A chamber for culturing the nematode *Panagrellus redivivus*. *Nature* 192:472 – 473.

Zemach, S. and K. Yona. 2008. Process for storing enriched nematodes. United States Patent Application Publication No. US 2008/0070289 A1.

ANEXOS

Métodos utilizados durante la realización de los experimentos.

I. Protocolo para la separación de Turbatrix aceti de una Dieta Artificial (DA)

Otro resultado preliminar fue la técnica para la separación de T. aceti de su medio de cultivo (ácido acético + extracto orgánico). El procedimiento se detalla a continuación:

1. Extracción de un litro de medio de cultivo en su zona superficial (menisco) por medio de una manguera.
2. Lavado con piseta con agua dulce.
3. Filtrado en una malla de 50 μm y escurrir bien, secar con tela absorbente.
- 4 Lavado con piseta con agua dulce. Concentrar en un vaso de Precipitados
- 5 Segunda filtración en una malla de 10 μm y escurrir bien, secar con tela Absorbente.
- 6 Lavado con piseta con agua dulce. Concentrar en vaso de precipitados. Dejar en agua dulce hasta ser utilizados a la salinidad deseada.

Método para el aislamiento de cultivos bacterianos del género Acetobacter

Debido a la importancia que representa el crecimiento de bacterias para sostener el crecimiento de la población de nematodos, se identificarán y cuantificarán las bacterias en la DB y DA a la temperatura que resultó óptima (20 a 25 C). Se utilizó un medio de identificación y cuantificación de bacterias acetogénicas el cual fué preparado en el Laboratorio de Microbiología de la U.M.S.N.H. y una vez montada la técnica se repitió en el laboratorio de Acuicultura, IIAF.

Las bacterias del ácido acético son seleccionadas como cepas productoras de ácido que forman zonas claras alrededor de las colonias en los platos de agar. Las cepas del Género Acetobacter son fácilmente diferenciadas de las sp. del Género Gluconobacter, Gluconacetobacter, Acidomonas, Asaia y Kozakia, por su habilidad de oxidar acetato y lactato a CO₂ y H₂O y por tener Q-9 como la principal ubiquinona.

Tabla 4. Medio para el aislamiento y cultivo de cepas de Acetobacter (Dworkin & Falkow, 2006)

Ingrediente	Para 1 L	Para preparar 1/2 L
pH	3.5	
Incubación de 3-5 días a	30 C	
Extracto de levadura	8.0 g	4 g
Peptona	5.0 g	2.5 g
D-Glucosa	20 g	10 g
Etanol	5.0 mL	2.5 mL

CaCO ₃	3.0 g	1.5 g
Agar	15.0 g	7.5 g
Acido acético		60 mL
Agua destilada	1000 mL	500 mL-2.5 mL= 497.5 mL

Para preparar 500 mL de medio es necesario primero medir 440 mL e ir agregando gradualmente el ácido acético (60 mL) para regular el pH el cual no baja a menos de 4.

Procedimiento de elaboración:

Pesar todos los ingredientes en un frasco de 500 mL mantener en agitación y medir pH (7.1) antes de agregar el Agar. Este volumen se utiliza por cuestiones prácticas ya que se facilita el vaciado del medio en las cajas Petri. Una vez regulado el pH, los frascos se cierran no totalmente (justo que soporten el ser levantados pero no cerrados totalmente y se meten a esterilizar junto con el resto de los materiales a utilizar: 18 Tubos para diluciones con agua destilada y cubiertos con aluminio y plástico adherente, varilla de dispersión, puntas para micropipeta.

Esterilización

Colocar en autoclave, si ésta no ha sido encendida, encender al MÁXIMO con válvula abierta. Si se precalentó, el material y medio es introducido a la autoclave, cerrar tapa y llaves y cerrar bien la válvula. La autoclave deberá subir a 1 lb de presión (o 120 C). Una vez alcanzada la presión se gira la perilla a MEDIO y se deja de 15 a 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se apaga y deja enfriar antes de extraer el medio y materiales.

Diluciones de la muestra

Se tomará una muestra de un cultivo de *T. aceti* en DA que ha sido madurado 1 mes a la temperatura óptima que se determine, la muestra será de 1 mL y será diluida para obtener una concentración de bacterias que permitan su cuantificación. A continuación se detalla el procedimiento de dilución:

1. Tomar 1 mL de muestra (DA) y vaciar a un tubo con agua destilada estéril con 9 mL = 10 mL = 10 a la menos 1 ó diluimos 10 veces la muestra.
2. De 10 a la menos 1 se toma 1 mL y vaciar a otro tubo con agua destilada estéril con 9 mL = 10 mL = 10 a la menos 2 (diluido 100 veces).
3. De 10 a la menos 2 se toma 1 mL y vaciar a otro tubo con agua destilada estéril con 9 mL = 10 mL = 10 a la menos 3 (diluido 1000 veces).

Siembra de muestra de DA y DB:

Para realizar la siembra para la identificación y cuantificación de *Acetobacter* es necesario preparar una campana para la siembra en condiciones estériles. Se utilizará una campana de extracción la cual ha sido previamente esterilizada con alcohol al 96% y donde se colocarán 2 mecheros para mantener un espacio estéril. Las cajas de Petri se colocarán sobre la superficie limpia y una vez colocadas se abrirán a la mitad las tapas. El medio esterilizado es entonces introducido a la campana, teniendo especial cuidado en esterilizar manos cada vez que salen de la campana. el

medio es vaciado lentamente en todas las cajas y una vez hecho esto, se tapan y se dejan reposar para que el agar solidifique. Una vez listas se procederá a la siembra de la muestra de PIM.

Se introducen a la campana los tubos de dilución, la varilla de dispersión y las puntas con micropipeta, todo esterilizado y limpiado con alcohol. De cada tubo (9) tomar 1microL de c/u y se coloca en una caja de Petri (c/microlitro), todo por triplicado. Una vez tomado el microlitro se utiliza una varilla p/dispersión para distribuir el volumen en todo el medio y se tapa inmediatamente. Una vez terminada la siembra las cajas se cierran con plástico adherente y se colocan boca a bajo para evitar que la humedad dañe o contamine el cultivo.

Dejar en incubación a 30 C por 3 a 5 días (o menos) Cuando todas las cajas presentan crecimiento. Si después de 5 días no crecen se pueden desechar. o esperar más de 5 días si no aparece aun crecimiento (Depende de la(s) especies).

Conteo de colonias de bacterias:

Para cuantificar las bacterias se extraen las cajas de la incubadora y se colocan en refrigeración para conteo posterior o bien se cuentan de la siguiente forma:

- 1) Se divide con un marcador la caja de Petri en 4, y se cuentan las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)
- 2) El resultado se multiplica por 4 (cuadrantes) para calcular el total de colonias.
- 3) El resultado ahora se multiplica por 10,100,1000,10,000 , dependiendo la dilución que se sembró (10-1, 10-2, 10-3, etc).
- 4) Los resultados se registran en forma de tabla para su posterior análisis estadístico.