

Cultivo de organismos acuáticos parte 1

Crecimiento poblacional de *Daphnia magna* Strauss bajo condiciones de cultivo

A. A. Ortega-Salas *
H. Reyes-Bustamante **

Resumen

Con el fin de conocer la tasa de crecimiento poblacional, la longevidad y el tiempo en que *Daphnia magna* alcanza la máxima producción. Se utilizaron tres matraces de 2,000 ml. En cada uno se sembró un organismo de *D. magna* de un día de nacido. Se les alimentó con cultivos puros de *Kirchneriella obesa* a una densidad de 1'000,000 céls/ml. La concentración de oxígeno varió entre 2 y 6 ppm y la temperatura fluctuó entre 22 y 23°C. A partir del día 6, en que se empezaron a reproducir, diariamente se contó y registró el incremento de individuos por partenogénesis. En 24 días se obtuvieron 2,941, 3,700 y 2,345 organismos. La longevidad de las tres *D. magna* se calculó en 28 días.

Abstract

In order to know the rate of population growth, longevity and time in which *Daphnia magna* reaches the maximum production, three 2,000 ml flasks were used. Each one was seeded with one day old *Daphnia*. At day 6 they started to reproduce by parthenogenesis. The neonates were counted daily and recorded. In 24 days 2,941, 3,700 and 2,345 organisms were born. The longevity of the three *Daphnia* was calculated to be 28 days. They were fed with *Kirchneriella obesa* to a density of 1'000,000 cells/ml. The oxygen concentration varied between 2 and 6 ppm and temperature fluctuated between 22 and 23°C.

Introducción

Los cladoceros, son pequeños crustáceos de agua dulce comúnmente llamados pulgas de agua, por su pequeño tamaño y por su movimiento en el agua (Snell, 1988). Muchas especies de agua dulce de la familia Daphniidae, orden Cladocera, son cosmopolitas. El género *Daphnia* spp. es el más diverso de los daphnidos y es el mejor alimento para peces dulceacuícolas en desarrollo y adultos. *Daphnia magna* Strauss se ha usado por muchos años como alimento en muchas piscifactorías. Muchos autores de libros de acuarismo (Emmens, 1974) han reportado que *Daphnia* spp. es el mejor alimento para peces tropicales. En las investigaciones de laboratorio en-

caminadas al desarrollo de técnicas de cultivo de *Daphnia* spp, no suele presentar ningún problema, pero cuando las técnicas son aplicadas a producciones comerciales, la disponibilidad de las cantidades suficientes de *Daphnia* spp para la alimentación de larvas de peces, se convierte en un factor limitante de las posibilidades de producción y de la rentabilidad del cultivo (Yufer y Pascual, 1980). El objetivo de este estudio fue conocer la tasa de crecimiento poblacional, la longevidad y el tiempo en que *D. magna* alcanza la máxima producción, usando la microalga *Kirchneriella obesa* como alimento.

Materiales y métodos

Los organismos de *D. magna* proceden de una cepa obtenida de la Escuela de Biología del Insituto Politécnico Nacional.

* Director del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México.
** Profesor e Investigador de la Universidad Autónoma de Sinaloa y responsable del laboratorio de Acuicultivos de la misma Universidad.

Preparación del medio de cultivo.- Se prepararon tres matraces Erlenmeyer de 2,000 ml, al 50% de su volumen. Se agregó agua natural esterilizada con 1 ml de cloro comercial. Después de una hora se agregó 1 ml de solución de tiosulfato de sodio al 10% normal por litro, a fin de eliminar el cloro. Se inoculó una *D. magna*, recién nacida, en cada recipiente. Diariamente, se alimentaron con cultivos de la microalga *K. obesa* a una densidad de 1'000,000 céls/ml, cada 24 hrs. El medio de cultivo se cambió cada tres días. El fotoperíodo fue de 12: 12.

Producción de microalgas.- La cepa de *K. obesa* se aisló de una muestra de agua del Río Elota, Sinaloa y fue identificada en el laboratorio de plancton de la Estación Mazatlán, ICML, UNAM. El método que se usó para la producción de las microalgas fue el método F/2 de Guillard. Los recuentos de microalgas se hicieron utilizando un microscopio compuesto y un hematocitómetro.

Crecimiento poblacional.- Se inició con un organismo recién nacido, en cada uno de los tres matraces. A partir del día 6 en que se empezaron a reproducir, diariamente, se registró el número de individuos vivos nacidos por partenogénesis. El crecimiento poblacional se registró durante 24

días, contando la población existente en cada matraz.

La ecuación utilizada fue: $N_t = N_0 e^{kt}$ donde, N_t : número de organismos en el tiempo (t); N_0 : intercepto con la ordenada "y"; e: base de los logaritmos naturales; k: tasa específica de crecimiento; y t: tiempo.

Resultados

El oxígeno registrado fluctuó entre 2 y 6 ppm; la temperatura varió entre 22 y 23 °C.

Crecimiento poblacional.- Las Figs. 1 y 2 muestran la curva de crecimiento poblacional real de cada matraz con la sumatoria y la curva calculada del promedio. Está dada por la siguiente ecuación:

$$N_t = 1.6224 e^{0.37635694 t} \quad r = 0.96,$$

donde, r: coeficiente de correlación.

Se obtuvieron 2,491, 3,700 y 2,345 individuos por matraz a densidades que variaron entre 1,172., 1,245. y 1,850. individuos/litro. La producción a partir de 3 individuos de *D. magna* en 24 días fue de 8,966 individuos, que sobrevivieron 28 días. La máxima producción fue el día 24.

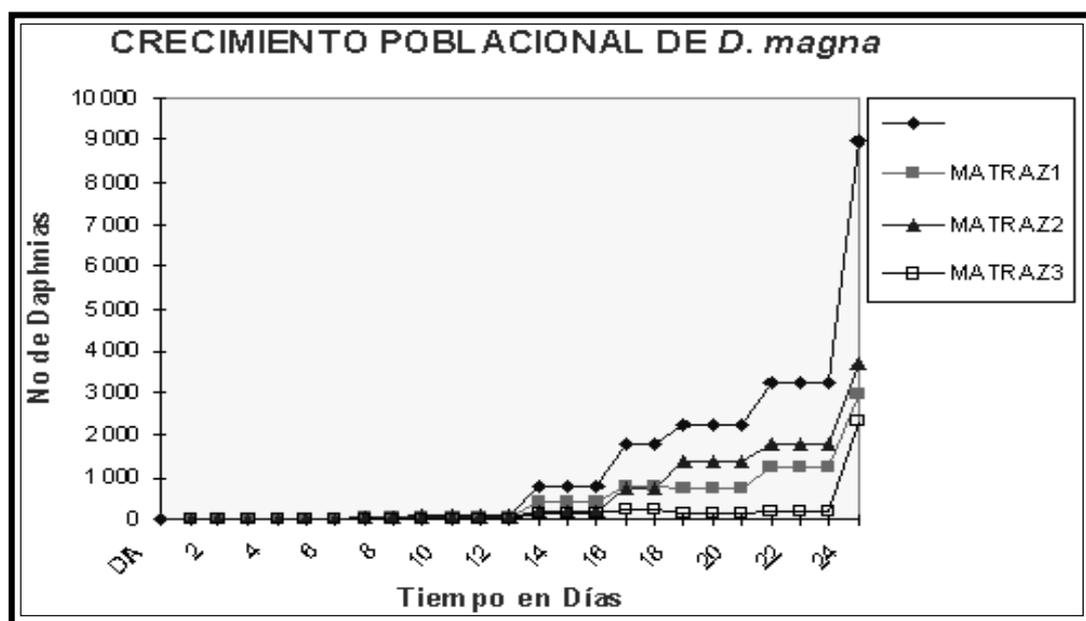


FIG. 1. CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *D. MAGNA* EN TRES MATRACES Y LA SUMA DE ELLOS

Discusión

Sevrin-Reyssac (1993) calculó una producción de 200 a 400 g/m³/semana de *D. magna* alimentada con microalgas cultivadas en un medio de estiércol de cerdo en tanques de 2 m³ durante el verano (18-25 t °C) y de menos de 30 g/m³/semana en invierno, a pesar de alimentar con altas concentraciones de microalga. En el presente trabajo se menciona, que el máximo número de individuos a partir de tres *D. magna* en 24 días fue de 8,986 individuos y por experiencia propia se han calculado 1,000 individuos por gramo. Por otra parte Cox *et al.* (1992) ajustaron la tasa maternal manteniendo un volumen constante de medio y ofreciendo *Chlorella* sp. como alimento, pero variando el número de *Daphnia* sp. por recipiente; a densidades bajas, grandes cantidades de neonatos se produjeron por hembra, más que a densidades altas.

Cowgill *et al.* (1985) reportaron, que de dos medios, uno inorgánico y otro orgánico empleando *Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus convolutus*, y *Chlamydomonas reinhardtii* como alimento para *D. magna*, el mayor número de neonatos nacidos (10.8 µg / neonato), fueron de un medio de cultivo mixto de algas desarrolladas en un medio orgánico, mientras que un número menor (20 µg por neonato), fue obtenido de una dieta sintética. En el presente trabajo

se les alimentó exclusivamente con *K. obesa* con buenos resultados, aunque, una mezcla de microalgas debe ser mejor. Si se considera una media de 15 µg por neonato, el resultado obtenido de neonatos por matraz en el presente trabajo sería de 0.0176 g, 0.0187 g y 0.0278 g por litro, respectivamente, en 24 días. Si esto lo extrapolamos a una curva de crecimiento poblacional de neonatos, se podría obtener una curva de biomasa.

Sun-Meijuan *et al.* (1991) mencionan que *Daphnia magna* crece y se reproduce de una manera normal entre 15 y 31 °C y a esta última temperatura y alimentadas con algas verdes frescas, la máxima longitud alcanzada fue de 3.65 mm y el máximo número de huevos por camada fue de 26, que comparando con los resultados de éste trabajo la máxima longitud alcanzada fue de 4.70 mm alimentadas con *K. obesa*.

Conclusiones

- La producción de tres *D. magna* en 24 días fue de 8,966 neonatos.
- La ecuación $N_t = 1.6224 e^{0.37635694 t}$ describe adecuadamente ($r=0.96$) el crecimiento poblacional de *D. Magna* bajo condiciones de cultivo.
- La máxima producción fue a los 24 días.
- La longevidad de las tres *D. magna* iniciales fue de 28 días.

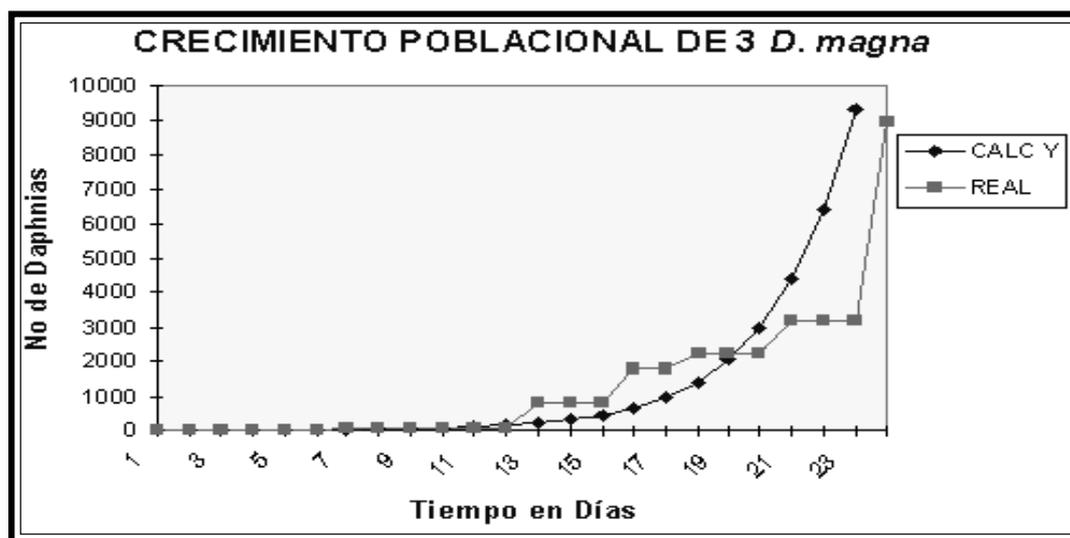


FIG. 2. SUMA DE LOS ORGANISMOS DE LOS TRES MATRACES (REAL) Y LA CURVA CALCULADA.(CALC Y)

Agradecimientos

Se agradece a L. Graciano Valenzuela su participación como técnico calificado en la realización del presente trabajo.

Bibliografía

Cowgill, U.M.; Hopkins, D.L.; Applegath, S.L.; Takahashi, I.T.; Brooks, S.D.; Milazzo, D.P. 1985. «Brood size and neonate weight of *Daphnia magna* produced by nine diets». 8° Symposium on Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, Fort Mitchell, KY (USA), 15-17 Apr. 1984. Bahner, R.C.; Hansen, D.J. (eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. Eighth Symposium*. 891: 233-244.

Cox, E.J.; Naylor, C.; Bradley, M.C.; Calow, P. 1992. «Effect of differing maternal ration on adult fecundity and offspring size in laboratory cultures of *Daphnia magna* Straus for ecotoxicological testing». *Aquat. Toxicol.* 24 (1-2): 63-74.

Emmens, C.W. 1974. *How to keep and breed tropical fish*. Brookvale, Australia, T.F.H. Publications, Inc. Ltd. 250 pp.

Sevrin-Reyssac, J. 1993. «Performances and constraints of intensive rearing of the cladoceran *Daphnia magna* Straus, utilization of produced biomass». 1ª European Crustacean Conf., Paris (France), 31 Aug 4 Sep, 1992. Proceedings of the first European Crustacean Conference, 1992. *Actes de la Premiere Conference Europeenne Sur les-Crustaces*, 1992. 64 (3): 357-360.

Snell, T.W. and F.H. OFF 1988. «Recent advances in rotifer culture». *Aquaculture Magazine*, p 39-40.

Sun-Meijuan; Zhang, Yongyuan; Cai, Junpeng. 1991. «Preliminary study of breeding and biology of *Daphnia magna* HB, a high temperature resistant species». *Acta Hydrobiol. Sin.* Shuisheng Shengwu Xuebao. 15 (2): 166-173.

Yufera, M. y Pascual, E. 1980. «Estudio del rendimiento de cultivo del rotífero *Brachiounus plicatilis*», *Hidrobiol. Soc. URSS*, pp 148.

Parte II

Crecimiento de *Daphnia magna* Strauss alimentada con *Kirchneriella obesa* (W. West) W. West y G. S. West, y con levadura de pan

A.A. Ortega-Salas *
H. Reyes-Bustamante **

Resumen

El propósito fue conocer la tasa de crecimiento en cuanto a largo y ancho de *Daphnia magna*. En el primer ensayo, se alimentaron con *Kirchneriella obesa*. El experimento se realizó en un matraz de dos litros, que fue sembrado con 50 D. magna de un día de nacidas. En un período de 21 días, tanto el largo como el ancho aumentó en promedio de 800 μm y de 400 μm a 4,400 μm y 3,200 μm , respectivamente. En el segundo ensayo, se alimentaron con dos tipos de alimento, *K. obesa* por una parte y levadura de pan por la otra. *D. magna* alimentada con *K. obesa* tuvieron una longitud asintótica promedio calculada de 5,325 μm y alimentadas con levadura de pan fue de 2,986 μm . En cuanto al ancho fue de 4,504 μm alimentadas con *K. obesa* y con levadura de pan fue de 2,268 μm . El oxígeno registrado fluctuó entre 2 y 6 ppm y la temperatura, entre 22 y 23°C.

Abstract

The aim was to know the growth rate of the length and width of *Daphnia magna*. In the first trial, they were fed with *Kirchneriella obesa*. The experiment was carried out in a two litre flask, which was seeded with 50 D. magna one day old. In 21 days, the length and width increased an average of 800 μm and 400 μm to 4,400 μm and 3,200 μm , respectively. In the second trial, two litre flasks were used; in one they were fed with *K. obesa* and in the other, they were fed with yeast. *Daphnias* fed with *K. obesa* had an average asymptotic length of 5,325 μm and the ones fed with yeast reached 2,986 μm . In regard to the width they reached 4,504 μm fed with *K. obesa* and the ones fed with yeast reached 2,268 μm . The oxygen fluctuated between 2 and 6 ppm and the temperature fluctuated between 22 and 23°C.

Introducción

El género *Daphnia* es el más diverso de los daphnidos y es el mejor alimento para peces dulceacuícolas jóvenes y adultos. *Daphnia magna* Strauss se ha usado por muchos años como alimento en muchas piscifactorías. Muchos autores de libros de acuarismo (Axelrod, 1978) han reportado que *Daphnia* es el mejor alimento para peces tropicales.

Los valores obtenidos por el análisis de *D. magna*, base seca, varían entre 42% y 52% de proteína, aunque Sevrin-Reyssac (1993) mencio-

na que *D. magna* tiene 60% de proteínas de su peso seco y sus aminoácidos son favorables para los requerimientos nutricionales de los alevines; sin embargo el valor nutricional de *D. magna* varía considerablemente, dependiendo de la edad y tipo de alimento. Los adultos tienen más cantidad de grasa que los jóvenes con un 20-27% (Ivleva, 1969). *Daphnia* se alimenta de varios tipos de bacteria, microalgas, levadura, detritus orgánico.

La composición de los ácidos grasos es importante en la supervivencia y crecimiento de larvas de peces. Los ácidos grasos altamente insaturados del tipo omega-3 son esenciales para muchas especies de peces y son producidos por algunos géneros de microalgas: *Chlorella* sp., *Ankistrodesmus* sp. y *Scenedesmus* sp. (Snell, 1987).

* Director del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México.

** Profesor e Investigador de la Universidad Autónoma de Sinaloa y responsable del laboratorio de Acuicultivos de la misma Universidad.

Se ha demostrado que el crecimiento de larvas de peces de los géneros *Carassius*, *Betta* y *Trichogasteres* más acelerado, cuando consumen alimentos vivos; asimismo, la mortalidad disminuye (Reyes *et al.* 1996). En las investigaciones de laboratorio encaminadas al desarrollo de técnicas de cultivo de *Daphnia*, no suele presentar ningún problema, pero cuando las técnicas son aplicadas a producciones comerciales, la disponibilidad de las cantidades necesarias de *Daphnia* para la alimentación de larvas de peces, se convierte en un factor limitante de las posibilidades de producción y de la rentabilidad del cultivo (Yufer y Pascual, 1980).

El objetivo del presente estudio es conocer la tasa de crecimiento en cuanto a largo y ancho con alimentación de microalgas del género *Kirchneriella obesa* por una parte y levadura de pan por otra.

Materiales y métodos

Preparación del medio de cultivo.- En el primer ensayo, se preparó un matraz Erlenmeyer de 2,000 ml al 50% de su volumen; se agregó agua natural esterilizada con 1 ml de cloro comercial. Después de una hora se agregó 1 ml de solución de tiosulfato de sodio al 10 % normal por litro, a fin de eliminar el cloro. Se inocularon 50 *D. magna* de un día de edad en el matraz. El medio de cultivo se cambió cada tres días.

Producción de microalgas.- La cepa de *K. obesa* se aisló de una muestra de agua del Río Elota, Sinaloa y fue identificada en el laboratorio de plancton del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML), UNAM.

El método que se usó para la producción de las microalgas fue el F/2 de Guillard. Los recuentos de microalgas se hicieron utilizando un microscopio compuesto y un hematocitómetro. El fotoperíodo fue de 12: 12.

En el primer ensayo (A), se sembraron 50 organismos de un día de nacidos; diariamente se muestrearon tres individuos durante 21 días, se midieron a lo ancho y a lo largo con un ocular micrométrico. Se les alimentó con *K. obesa* a una densidad de 1,000,000 cel/ml, cada 24 horas.

En el segundo ensayo (B) se siguió el mismo procedimiento que en el primero; se utilizaron dos medios de cultivo para *D. magna* en 5 matraces de 2 l cada uno, a uno se le proporcionó *K. obesa* 1,000,000 cel/ml como alimento, durante 36 días del 8-01-97 al 13-02-97; y en el otro medio se les proporcionó levadura de pan a razón de un gramo/20 l, durante 17 días del 14 al 31 02 97. Se calculó el promedio de ancho y largo entre 2 y 3 organismos que se midieron, utilizando un microscopio estereoscópico y un micrómetro ocular.

Crecimiento individual.- De la curva largo y ancho-edad resultante se ajustó el modelo de crecimiento de Von Bertalanffy (1938): $L_t = L_8 [1 - e^{-k(t-t_0)}]$ donde; k: tasa de crecimiento; L_8 : longitud asintótica media; L_t : longitud a la edad t; t_0 : tiempo cuando *D. magna* tiene una longitud cero; t: tiempo en meses.

Relación ancho-largo.- Se utilizó el método de los mínimos cuadrados para calcular la relación ancho-largo mediante la fórmula, $A = a + Lx$, donde, A: ancho total en micras; L: longitud total en micras, y r: coeficiente de correlación.

El oxígeno registrado fue aproximadamente entre 2 y 6 ppm; la temperatura varió entre 22 y 23 °C.

Resultados

El oxígeno registrado fue aproximadamente entre 2 y 6 ppm; la temperatura varió entre 22 y 23 °C.

Crecimiento individual.- A) En el primer ensayo, se alimentó a *D. magna* con *K. obesa*. La Fig. 1, muestra el promedio real y el calculado del crecimiento en largo y ancho, por medio del método de Von Bertalanffy; éste está dado por las siguientes ecuaciones:

$$\text{Largo } (\mu\text{m}): L_t = 4,817.662 (1 - e^{-0.145041(t + 0.2820158)})$$

$$\text{Ancho } (\mu\text{m}): L_A = 3,666.0 (1 - e^{-0.12231(t - 0.07563863)})$$

Relación ancho-largo.- La Fig. 2, muestra la relación ancho-largo que está dada por la ecuación aritmética siguiente:

$$A = 0.781679 (L) - 299.6946$$

$$n = 21 \quad r = 0.996$$

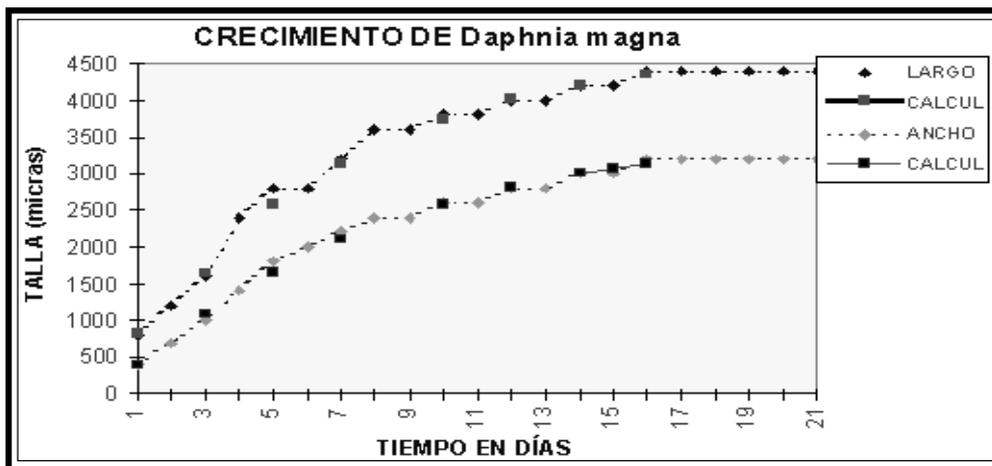


FIG.1. CRECIMIENTO PROMEDIO DE *Daphnia magna* Y LA CURVA CALCULADA DE LARGO Y ANCHO POR EL MÉTODO DE VON BERTALANFFY.

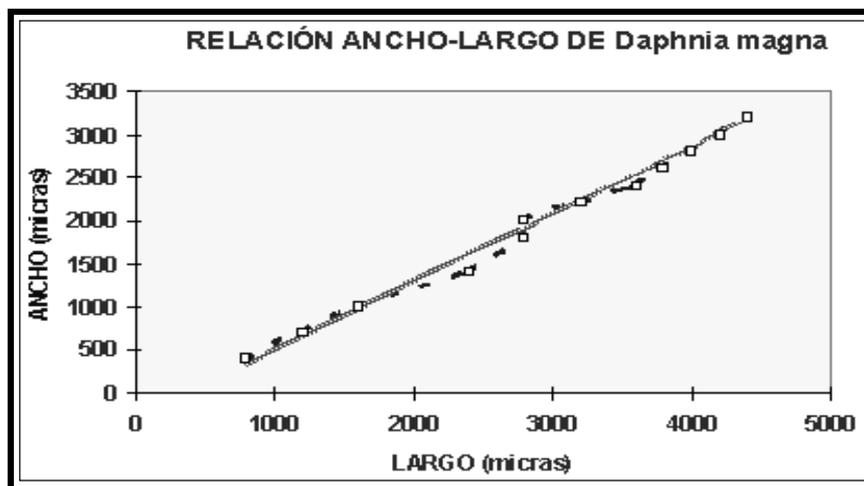


FIG.2. RELACIÓN ANCHO-LARGO DE *D. magna*, PROMEDIOS Y LÍNEA CALCULADA.

Crecimiento individual. - B) Para el segundo ensayo, Figs.3-9, *D. magna* alimentada con *K. obesa*, el crecimiento está dado por las siguientes ecuaciones:

1) Figura 3 Largo (μm):

$$L_t = 5325.739 (1 - e^{-0.05515(t + 3.267915)})$$

2) Figura 5 Ancho (μm):

$$L_A = 4504.38 (1 - e^{-0.040067(t + 4.237)})$$

El crecimiento de *D. magna* alimentada con levadura de pan está dado por las ecuaciones:

1) Figura 4: Largo (μm):

$$L_t = 2986.58 (1 - e^{-0.1410288(t - 1.133538)})$$

2) Figura 6: Ancho (μm): $L_A = 2268.88 (1 - e^{-0.12594(t + 0.8515578)})$

Una prueba t mostró que hubo una diferencia significativa en la tasa de crecimiento K para los diferentes tipos de alimentos proporcionados a *D. magna* ($t = 1.4617$; d.f. = 1; $P < 0.05$). El resultado del crecimiento fue más favorable para *D. magna* alimentadas con *A.obesa* que con levadura de pan. y se puede apreciar en las Figs. 7 y 8.

Relación ancho-largo. - La Fig. 9, muestra la relación ancho-largo de *D. magna* alimentada con *K. obesa*, ésta está dada por la siguiente ecuación:

$$A = 0.7936568 - 211.16613(L)$$

$n=185$ $r=0.996$, y la relación ancho - largo de *D. magna* alimentada con levadura está dada por la siguiente ecuación:

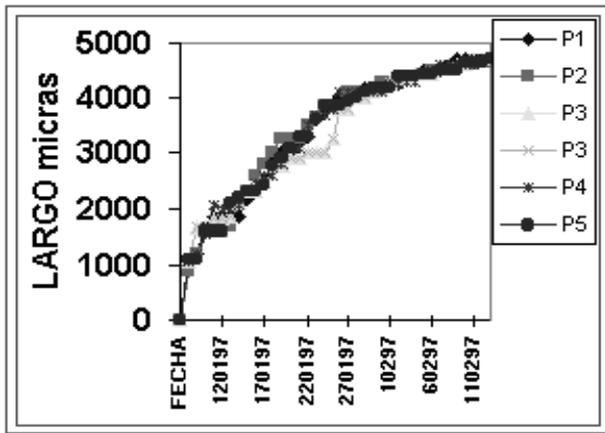


FIG.3. CRECIMIENTO EN LARGO PROMEDIO DE *D. magna* DE 5 MATRACES (P) ALIMENTADA CON *K. obesa*.

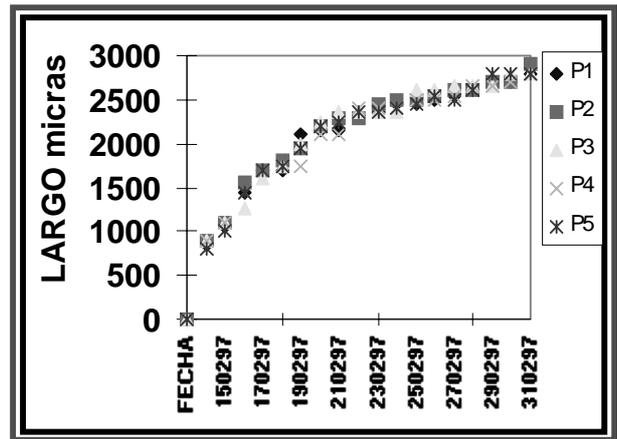


FIG.4. CRECIMIENTO EN LARGO (μM) PROMEDIO DE *D. magna* DE 5 MATRACES (P) ALIMENTADA CON LEVADURA DE PAN.

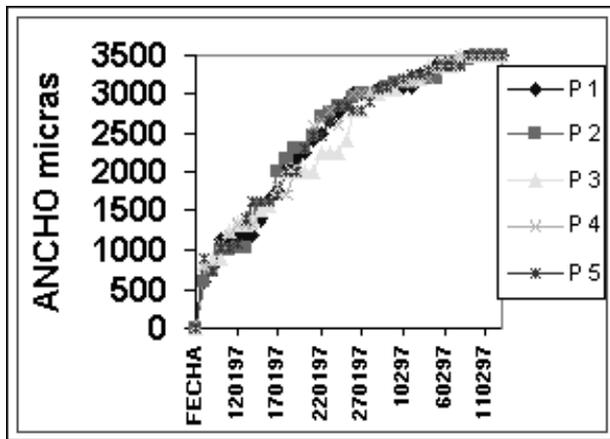


FIG.5. CRECIMIENTO EN ANCHO (μM) PROMEDIO DE *D. magna* DE 5 MATRACES (P) ALIMENTADA CON *K. obesa*.

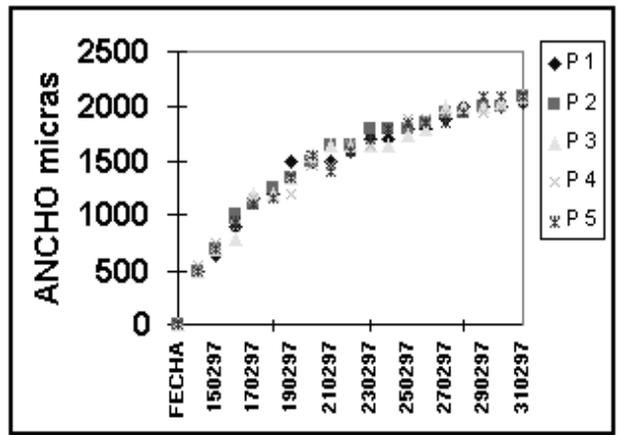


FIG.6. CRECIMIENTO EN ANCHO (μM) PROMEDIO DE *D. magna* DE 5 MATRACES (P) ALIMENTADA CON LEVADURA DE PAN.

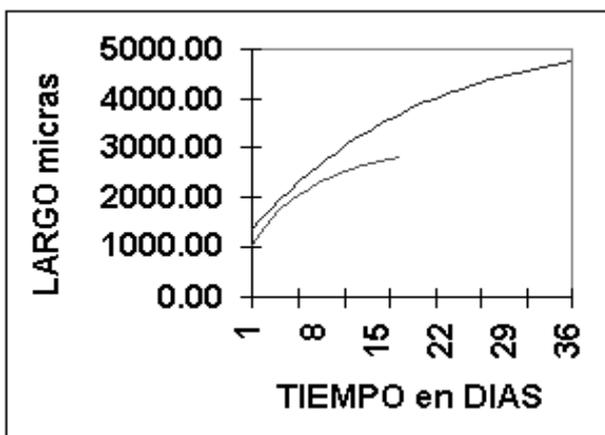


FIG.7. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO EN LARGO (μM) DE *D. magna* ALIMENTADAS CON *K. obesa* Y CON LEVADURA DE PAN.

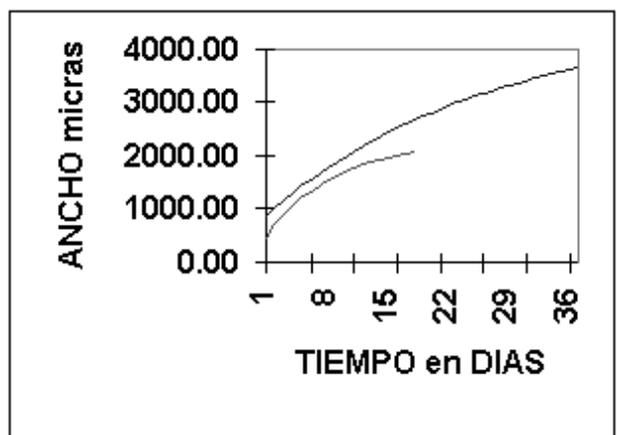


FIG.8. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO EN ANCHO (μM) DE *D. magna* ALIMENTADAS CON *K. obesa* Y CON LEVADURA DE PAN.

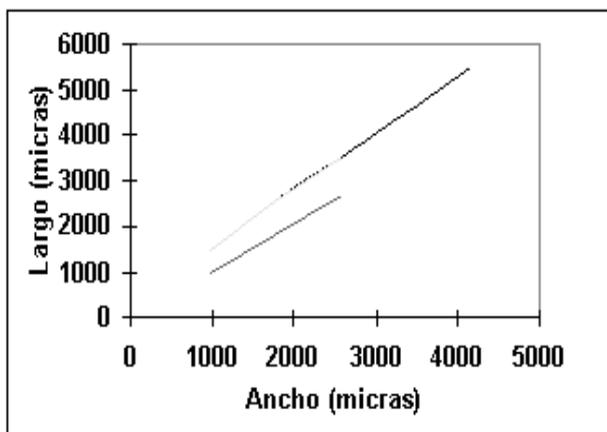


FIG.9. DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS PENDIENTES EN LA RELACIÓN LARGO-ANCHO DE *D. magna*, ALIMENTADAS CON *K. obesa* Y CON LEVADURA DE PAN.

$$A = 0.8173 - 228.3 (L), n = 90 \quad r = 0.994$$

En la relación ancho-largo, tienen mayor pendiente *D. magna* alimentadas con *K. obesa*, que alimentadas con levadura de pan; es decir, que a una determinada medida de ancho hay mayor largo cuando se alimentan con la microalga.

Discusión

Sevrin-Reyssac (1993) calcularon una producción de 200 a 400 g/m³/semana de *D. magna* alimentada con microalgas cultivadas en un medio de estiércol de cerdo en tanques de 2 m³ en verano (18-25 T °C) y de menos de 30 g / m³ / semana en invierno a pesar de alimentar con altas concentraciones de microalga. Por experiencia propia se han calculado 1,000 individuos por gramo a partir de un metro cúbico. También menciona que por su alta capacidad de filtración tiene un efecto de purificación del medio, lo que aumenta la transparencia y por ende la proliferación de algas macrofitas. Además, *D. magna* tiene 60% de proteínas de su peso seco y sus aminoácidos son favorables para los requerimientos nutricionales de los alevines. Y últimamente, se le ha extraído la quitina del caparazón y utilizada con propósitos industriales.

Cox *et al.* (1992) ajustaron la tasa maternal manteniendo un volumen constante de medio y ofreciendo *Chlorella* spp. como alimento, pero

variando el número de organismos por recipiente; a densidades bajas, grandes cantidades de neonatos se produjeron por hembra, más que a densidades altas. *D. magna* colectada de un estanque de peces en China (Sun Meijuan, 1991), en el laboratorio muestra que crece y se reproduce normalmente entre 15 y 31 °C alimentada con alga verde fresca; a 31 °C alcanza una longitud máxima de 3.65 mm y el máximo número de huevos puestos fue de 26.

Cowgill *et al.* (1985) encontraron que de dos medios, uno orgánico y otro inorgánico, empleando *Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus convolutus*, and *Chlamydomonas reinhardtii* como alimento para *D. magna*, el mayor número de neonatos nacidos, fueron de un medio de cultivo mixto de algas desarrolladas en un medio orgánico, mientras que un número menor, fue obtenido de una dieta sintética; del mayor número de neonatos nacidos, los individuos fueron ligeros (10.8 µm g por neonato), mientras que de los que nacieron pocos, pesan más (20 µm g por neonato).

Combres *et al.* (1993), menciona, que *Daphnia* es fácilmente cultivada en una solución de estiércol de cerdo y se pudieron producir de 100-400 g/m³ / semana de junio a septiembre de 1991 y de 30-80 / m³ / semana de octubre a diciembre. Una aplicación de simazina destruye casi todas las algas macrofitas en 5 días, sin ningún efecto para la *Daphnia* spp.

La carpa herbívora, *Ctenopharingodon idella* consume las macrofitas, eficientemente, pero sólo a temperaturas arriba de los 15-17 °C y se sabe que estos peces se alimentan de *Daphnia* spp. cuando no hay vegetación; un pez de 30 g elimina todas las *Daphnias* spp. cultivadas en 1 m³.

Sun-Meijuan *et al.* (1991) mencionan que *D. magna* crece y se reproduce de una manera normal entre 15 y 31 °C y a esta última temperatura y alimentadas con algas verdes frescas, la máxima longitud alcanzada fue de 3.65 mm y el máximo número de huevos por camada fue de 26, que es poco comparando con los resultados de este trabajo donde la máxima longitud alcanzada fue de 4.70 mm, alimentando con *Kirchneriella obesa*.

Ranta *et al.* (1993) calcularon que el crecimiento de *D. magna*, *D. longispina* y *D. pulex* fue lineal y que la temperatura ambiente afecta la tasa de crecimiento diario, principalmente relacionado con la longitud de la cabeza y la espina. Comparando con los datos presentados en este trabajo es claro que el crecimiento no es lineal y que adapta bien al modelo de crecimiento de von Bertalanffy (1938) a una temperatura de 22-23 ° C.

Conclusiones

- *D. magna*, alimentada con microalgas, crecen en ancho 3,666 y 4,504 μm , y de largo 4,817.662 y 5325.739 μm .
- *D. magna*, alimentadas con levadura, crecen en ancho: 2,268.88 μm y de largo: 2,986.58 μm .
- Se ajusta bien al modelo de Von Bertalanffy.
- Se ajusta bien la relación aritmética ancho-largo.

Agradecimientos

Se agradece a L. Graciano Valenzuela su participación como técnico calificado en la realización del presente trabajo.

Bibliografía

- Axelrod H. 1978. *Peces Tropicales*. Barcelona, 265 pp.
- Combres, C.; Sevrin-Reyssac, J.; Djonga, L. 1993. «Biomass production and environmental conditions for raising *Daphnia* with their microalgal food» Int. Conf. Bordeaux Aquaculture, Bordeaux (France), 25-27 Mar, 1992. *Production, Environment and Quality*. Ghent-Belgium European Aquaculture society (18): 63-70.
- Cowgill, U.M.; Hopkins, D.L.; Applegath, S.L.; Takahashi, I.T.; Brooks, S.D.; Milazzo, D.P. 1985. «Brood size and neonate weight of *Daphnia magna* produced by nine diets». 8° Symposium on Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, Fort Mitchell, KY (USA), 15-17 Apr. 1984. Bahner, R.C.; Hansen, D.J. (eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. Eighth Symposium*. 891: 233-244.
- Cox, E.J.; Naylor, C.; Bradley, M.C.; Calow, P. 1992. «Effect of differing maternal ration on adult fecundity and offspring size in laboratory cultures of *Daphnia magna* Straus for ecotoxicological testing». *Aquat. Toxicol.* 24 (1-2): 63-74.
- Gulland, J.A. 1969. «Manual of methods for fish stock assessment. Part 1. Fish population analysis». *FAO Man. Fish. Sci.*, (4):154 p.
- Ivleva, Y. V. 1969. *Mass cultivation of invertebrates, Biology, and Methods*. Acad. Sci. URSS. Hidrobiol. Soc. 148 pp.
- Ranta, E.; Bengtsson, J.; McManus, J. 1993. «Growth, size and shape of *Daphnia longispina*, *D. magna* and *D. pulex*». *Ann. Zool. Fenn.* 1993. 30, (4): 299-311.
- Reyes-Bustamante, H; B.Martínez; A.A.Ortega-Salas; y A.Alamilla. «Crecimiento de crías de tres especies de peces ornamentales (*Carassius auratus*, *Betta lendens* y *Trichogaster trichopterus*), bajo diferentes tipos de alimentación». *V Congreso Nacional de Ictiología*. Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sin. del 3 al 5 de febrero de 1997.
- Sevrin-Reyssac, -J. 1993. «Performances and constraints of intensive rearing of the cladoceran *Daphnia magna* Straus, utilization of produced biomass». 1° European Crustacean Conf., Paris (France), 31 Aug 4 Sep, 1992. *Proceedings of the first European Crustacean Conference, 1992. Actes de la Premiere Conference Europeenne Sur les Crustaces*, 1992. 64 (3): 357-360.
- Snell, T.W. and F.H. OFF 1988. «Recent advances in rotifer culture». *Aquaculture Magazine*, p 39-40.
- Sun-Meijuan; Zhang, Yongyuan; Cai, Junpeng. 1991. «Preliminary study of breeding and biology of *Daphnia magna* HB, a high temperature resistant species». *Acta Hydrobiol. Sin.* Shuisheng Shengwu Xuebao. 15 (2): 166-173.
- Von Bertalanffy, L. 1938. «A quantitative theory of organic growth of animals». *Human Biology*, 10(2): 181-213.
- Yufer, M. y Pascual, E. 1980. «Estudio del rendimiento de cultivo del rotífero *Brachiouneus plicatilis*», *Hidrobiol. Soc. URSS*, pp 148.

Parte III

Producción de neonatos y mortalidad de *Daphnia magna* Strauss bajo condiciones de laboratorio

A.A. Ortega-Salas *
H. Reyes-Bustamante **

Resumen

En base al número de neonatos nacidos de nueve organismos de *Daphnia magna*, se calculó la reproducción, la tasa de mortalidad de los progenitores, así como los tiempos de maduración, número de camadas, y tiempos de reproducción. Se colocó un organismo recién nacido en cada uno de los nueve matraces de un litro utilizados, durante 37 días a una temperatura de 22-23°C y con una variación de oxígeno de 2 a 6 ppm. Se les alimentó con cultivos de *Kirchneriella obesa* a densidades de un millón de céls/ml. Se observó la primera reproducción partenogenética a los seis días de edad; nueve *D. magna* produjeron en promedio 99.64 neonatos/día. En total produjeron 1,855 neonatos en 36 días. Las 9 *Daphnias* progenitoras sobrevivieron 26 días y de este día al 37 tienen una tasa de sobrevivencia del 56%.

Abstract

Based on the number of neonates born from 9 *D. magna*, the reproduction, rate of mortality of the brood stock, as well as the time of ripeness, number and frequency of reproduction were calculated. During 37 days, in each one of 9 one liter flasks, one *D. magna* one day old was seeded, at a temperature of 22-23°C and with an oxygen variation of 2 to 6 ppm. They were fed with *Kirchneriella obesa* at density of one million cells/ml. The first parthenogenetic reproduction was at 6 days of age; 9 *D. magna* produced an average of 99.64 neonates/day. In total they produced 1,855 neonates in 36 days. The nine brood stocks survived 26 days and from that day to the 37th day they had a mortality rate of 44% and a surviving rate of 56%.

Introducción

Muchas especies de agua dulce de la familia Daphniidae, orden Cladocera, son cosmopolitas y tienen reproducción partenogenética. El género *Daphnia* es el más diverso de los daphnidos y es el mejor alimento para peces dulceacuícolas jóvenes y adultos. *D. magna* Strauss se ha usado por muchos años como alimento en muchas piscifactorías. Varios autores de libros de acuarismo (Emmens 1974) han reportado que *Daphnia* es el mejor alimento para peces tropicales.

En las investigaciones de laboratorio encaminadas al desarrollo de técnicas de cultivo de *Daphnia spp.*, no suele presentar ningún problema, pero cuando las técnicas son aplicadas a producciones comerciales, la disponibilidad de las cantidades necesarias

de *Daphnia* para la alimentación de larvas de peces, se convierte en un factor limitante de las posibilidades de producción y de la rentabilidad del cultivo (Yufero y Pascual, 1980). El objetivo del presente es calcular el número de neonatos nacidos, la tasa de mortalidad de los progenitores, así como los tiempos de maduración, número de camadas, y tiempos de reproducción de *D. magna*, utilizando *K. obesa* como alimento.

Materiales y métodos

Se prepararon nueve matraces Erlenmeyer de 1,000 ml al 50% de su volumen, se agregó agua natural esterilizada con 1 ml de cloro comercial. Después de una hora se agregó 1 ml de solución de tiosulfato de sodio al 10% normal por litro, a fin de eliminar el cloro.

Producción de microalgas. - La cepa de *Kirchneriella obesa* se aisló de una muestra de agua del Río Elota,

* Director del Instituto de ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México.

** Profesor e Investigador de la universidad Autónoma de Sinaloa y responsable del laboratorio de Acuicultivos de la misma Universidad.

Sinaloa y fue identificada en el laboratorio de plancton; Estación Mazatlán, ICML, UNAM.

El método que se usó para la producción de las microalgas fue el método F/2 de Guillard. Los recuentos de microalgas se hicieron utilizando un microscopio compuesto y un hematocitómetro. El medio de cultivo se cambió cada tres días. El fotoperíodo fue de 12:12.

Cálculo de la producción de neonatos. - En el medio de cultivo se inoculó una *Daphnia* de un día de edad, en cada uno de los nueve recipientes. Diariamente, se alimentaron con cultivos de *K. obesa* a densidades de 1'000,000 céls/ml. También, durante 37 días, se revisó el matraz, después de cada puesta de la hembra, se contaron los neonatos, y se separaron del medio. Se registró el intervalo de tiempo entre las puestas. Se utilizó el método Yamane (1970) para calcular la curva logística de crecimiento poblacional:

$$Y = k / (1 + e^{-a \cdot b(X)})$$

donde Y: número de individuos; X: tiempo; k: número de individuos promedio máximo; e: base de los logaritmos naturales; a y b: constantes. Este método se resume en la Tabla 2.

Mortalidad. - Se calculó el número de *D. magna* que sobrevivió del día 26 al 36, ya que el día 37 murieron todos los progenitores. La estimación de la tasa de mortalidad total (Z) fue calculada por el método de Beverton y Holt (1959) y la curva de captura en Ricker (1975) utilizando la relación $N_t = N_0 e^{-Zt}$ (basado en el método de los mínimos cuadrados no lineal) donde, N_t : número de individuos en el tiempo; N_0 : intercepto con la ordenada, eje de la "y"; e: base de los logaritmos naturales; y t: tiempo en días.

Resultados

El oxígeno registrado varió entre 2 y 6 ppm y la temperatura varió entre 22 y 23 °C.

En la Tabla 2 se muestran las nueve *D. magna* y el aumento del número de larvas recién nacidas, a partir del sexto día en que se reprodujeron. También se observa la frecuencia y número de camadas que presentan, además la mortalidad que sufren los progenitores, a través de los

37 días que duró el experimento. Se observaron las primeras reproducciones partenogenéticas a los 6 días de edad. La frecuencia y el número de camadas fue aproximadamente de 4 por día hasta el día 26. Nueve *D. magna* produjeron en promedio 99.64 neonatos/día. En total produjeron 1,855 neonatos en 36 días.

Cálculo de la producción de neonatos. - La suma acumulada de todas las larvas nacidas de las nueve *D. magna*, conforme pasó el tiempo, dio como resultado la siguiente curva logística:

$$N = 1,892.54 / (1 + e^{2.467 - 1.4225(X)}), \text{ (Fig. 1)}$$

Se calculó también el promedio de neonatos del día 6 al 22 (!4 días) y el promedio diario de producción de neonatos (Tabla 1).

Mortalidad. - Del número de neonatos nacidos de nueve *D. magna*, se registró la mortalidad (X) a partir del día 22 (Tabla 1). La mortalidad está dada por la siguiente ecuación:

$$N_t = 20.77 e^{-0.56(t)}, n= 16; r= 0.98.$$

La tasa de mortalidad del día 15 al 37 fue del 56% (Fig. 2).

Discusión

Martínez-Jerónimo *et al.* (1993) encontraron que alimentando a *D. magna* con *Ankistrodesmus falcatus* y *Senedesmus incrustatus* con concentraciones de 0.0018 (I), 0.0019 (II), y 0.0020 (III) mg/l (peso seco), la longevidad fue menor en dosis altas; el promedio para la primera reproducción fluctuó entre 11 y 12 días y la interpuesta varió de 4.1 a 5.8 días; así que el promedio de número de huevos y de nacimientos depende de la concentración de comida y parece que *S. incrustatus* (II) fue el mejor alimento para mantener una alta y constante producción de organismos. En el presente trabajo se les alimentó con *K. obesa*, la interpuesta fue aproximadamente de 4 días y la longevidad fue de 36 días. Cox *et al.* (1992) ajustaron la tasa maternal manteniendo un volumen constante de medio y ofreciendo *Chlorella* sp como alimento, pero variando el número de organismos por recipiente; a densidades bajas, grandes cantidades de neonatos se produjeron por hembra, más que a densidades altas.

Día org	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32	33	36	37	SUM	Suma 14 días	Prom.				
1	13				24			14		29			46		47	x												173	173	12.4				
2	11		16		29			29		28			36		47			5	25			x						226	196	14.0				
3	3	13		17		2		33		39			45		53			8		x		9	36	x				213	205	14.6				
4	5				14					23		25		40		17		18										187	107	7.6				
5	15		20		29		9			27			45		49		17	20				8	39			x		278	194	13.9				
6	2	6		7		2				23		21		33		23		24		21		17		13	12	x		204	94	6.7				
7	6	9		22		1		28		28		28		31	35		34		31	31	3		x		10			238	160	11.4				
8	14									9		24		39		16												102	86	6.1				
9	8	7		22								32		39	41		16			38								234	180	12.9				
SUM	77	35	36	68	96	5	9	135	55	123	130	172	182	182	272	56	0	122	45	90	3	9	61	39	13	22	0	1855		99.6				
Prom/ 14 días																	99.6																	
Día acu	6	7	8	9	10	11	12	13	15	16	17	18	19	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32	33	36	37								
77	112	148	216	312	317	326	461	461	516	639	769	941	1123	1395	1451	1451	1573	1618	1708	1711	1720	1781	1820	1833	1855									

TABLA 1. FRECUENCIA, NÚMERO DE CAMADAS Y CANTIDAD DE NEONATOS NACIDOS DE NUEVE *D. magna* DURANTE 36 DÍAS, ASÍ COMO EL REGISTRO DE LA MORTALIDAD (X) A PARTIR DEL DÍA 22. CÁLCULO DEL PROMEDIO DE NEONATOS DEL DÍA 6 AL 22 (14 DÍAS) Y EL PROMEDIO DIARIO DE PRODUCCIÓN DE NEONATOS.

X	Día	Y	Yc
	6	77	
	7	112	
0	8	148	148
	9	216	
	10	312	
	11	317	
	12	326	
	13	461	
1	14	461	492
	15	516	
	16	639	
	17	769	
	18	941	
	19	1123	
2	20	1123	1123
	21	1123	
	22	1395	
	23	1451	
	24	1573	
	25	1618	
3	25	1708	1624
	26	1711	
	28	1720	
	29	1781	
	30	1820	
4	31	1820	
	32	1820	1820
	33	1833	
	34	1833	
	35	1833	
	36	1855	

CURVA LOGÍSTICA

$$Yc = 1.892 / (1 + e^{-2.467 - 1.4225(X)})$$

X:0	equivale	8 días
X:1		14 días
X:2		20 días
X:3		25 días
X:4		32 días

TABLA 2. MÉTODO PARA CALCULAR LA CURVA LOGÍSTICA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL. LA X REPRESENTA LOS DÍAS QUE SE TOMAN PARA HACER EL CÁLCULO, EN LOS CUALES SE TIENE EL NÚMERO DE NEONATOS NACIDOS.

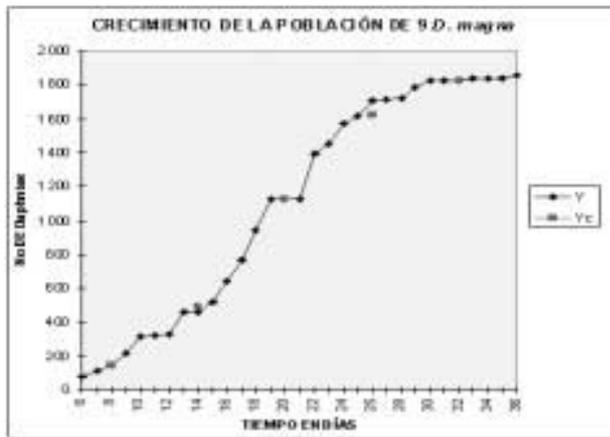


FIG. 1. CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN DE *D. magna* A PARTIR DE NUEVE ORGANISMOS EN 36 DÍAS. "Y" ES EL PROMEDIO DEL NÚMERO DE NEONATOS Y "YC" ES EL NÚMERO CALCULADO.

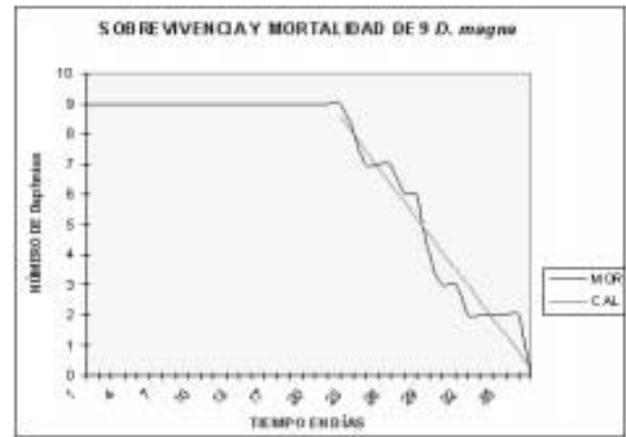


FIG. 2. SOBREVIVENCIA Y MORTALIDAD DE 9 *D. magna* EN 37 DÍAS.

Martínez-Jerónimo *et al.* (1994) alimentaron a *D. magna* con *Ankistrodesmus falcatus* y *Scenedesmus incrassatulus*, en concentraciones de 6, 12 y 18 mg/l y temperatura de 19 °C; mostraron que con mayor concentración de alimento hubo menor supervivencia, longevidad de 40-85 días, número de huevos de 9-23 e interpuesta de 4.2 a 5.8 días; los mayores valores se observaron con las menores concentraciones de comida; el promedio de progenie fue máximo. En concentraciones media: ambas microalgas tuvieron el mismo efecto en supervivencia y reproducción, aunque sí hubo cambio con la concentración; aún así parece que *S. incrassatulus* fue mejor alimento para *D. magna*. En el presente trabajo, la temperatura varió de 22-23 °C.

Sevrin-Reyssac (1993) calculó una producción de 200 a 400 g/m³/semana de *D. magna* alimentada con microalgas cultivadas en un medio de estiércol de cerdo en tanques de 2 m³ durante el verano (18-25 T °C) y de menos de 30 g/m³/semana en invierno a pesar de alimentar con altas concentraciones de microalga. Por experiencia propia se han calculado 1,000 individuos por gramo a partir de un metro cúbico. También menciona, que por su alta capacidad de filtración tiene un efecto de purificación del medio, lo que aumenta la transparencia y por ende la proliferación de algas macrofitas. Además menciona que *D. magna* tiene 60% de proteínas en su peso seco y sus aminoácidos son favorables para los requerimientos nutricionales de los alevines.

Finalmente menciona, que se le ha extraído la quitina del caparazón y ha sido utilizada con propósitos industriales. En el presente trabajo no se sabe la biomasa, aunque en un litro se produjeron 1,835 neonatos/l en 36 días a la temperatura mencionada y 2-6 ppm de oxígeno. *D. magna* colectada de un estanque de peces en China, muestra en el laboratorio, que crece y se reproduce normalmente entre 15 y 31 °C, alimentada con alga verde fresca; a 31 °C alcanza una longitud máxima de 3.65 mm y el máximo número de huevos puestos fue de 26 (Sun-Meijuan, 1991).

Cowgill *et al.* (1985) encontraron, que de dos medios, uno orgánico y otro inorgánico empleando *Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus convolutus*, y *Chlamydomonas reinhardtii* como alimento para *D. magna*, el mayor número de neonatos nacidos, fueron de un medio de cultivo mixto de algas desarrolladas en un medio orgánico, mientras que un número menor, fue obtenido de una dieta sintética; del mayor número de neonatos nacidos, los individuos fueron ligeros (10.8 mμ g por neonato), mientras que de los que nacieron pocos, pesan más (20 mμ g por neonato). Tomando como base estos resultados y si se toma un peso medio de 15 mμ g por neonato, 1,855 neonatos fue el total obtenido de nueve individuos, lo que da un peso de 0.0278 g en 37 días. Combres *et al.* (1993) menciona, que *D. magna* es fácilmente cultivada en una solución de estiércol de cerdo y se pueden producir de 100-

400 g/m³/semana de junio a septiembre de 1991 y de 30-80/m³/semana de octubre a diciembre.

Trubetskova y Lampert (1993), mencionan que el tamaño de los huevos es menor cuando se cultiva *D. magna* en un período de inanición, probablemente debido a que se limita la reproducción, y por tanto el tamaño de los neonatos es menor. Mencionan también, que la densidad de los huevos, independiente de los tratamientos, es de 0.37 mg peso seco/mm³.

Sun-Meijuan *et al.* (1991) indica que *D. magna* crece y se reproduce de una manera normal entre 15 y 31 °C y a esta última temperatura y alimentadas con algas verdes frescas, la máxima longitud alcanzada fue de 3.65 mm y el máximo número de huevos por camada fue de 26, que comparando con los resultados de este trabajo la máxima longitud alcanzada fue de 4.70 mm alimentadas con *K. obesa*.

Una aplicación de simazina destruye casi todas las algas macrofitas en 5 días, sin ningún efecto para la *D. magna*.

D. magna es una especie que reúne los requerimientos nutricionales de las larvas de peces, de acuerdo a los análisis bromatológicos que se han realizado (Emmens, 1974 y Sevrin-Reyssac, 1993).

Agradecimientos

Se agradece a L. Graciano Valenzuela su participación como técnico calificado en la realización del presente trabajo.

Conclusiones

- Se obtuvo una producción de 1,855 neonatos a partir de 9 *Daphnias* en 36 días.
- Se ajusta bien la curva logística del aumento del número organismos en los 36 días del experimento : $N = 1,892.54 / (1 + e^{2.467 - 1.4225(t)})$.
- El promedio de neonatos en los primeros 14 días fue de 99.6/día.
- El promedio de neonatos por *D. magna* fue de 11.1/día los primeros 14 días.

- La tasa de mortalidad del día 15 al 37 fue del 56%.

Bibliografía

Beverton, R.J.H. y S.J. Holt. 1959. «A review of the life span and mortality rates of fish in nature, and their relation to growth and other physiological characteristics». *CIBA Fdn. Colloq. Ageing* 5, 142-177.

Carrillo, M.; Dahle, L.; Morales, J.; Sorgeloos, P.; Svennevig, N.; Wyban, J. (Eds.). *From Discovery to Commercialization Oostende, Belgium* European Aquaculture Soc. 1993 no. 19 p. 240.

Combres, C.; Sevrin-Reyssac, J.; Djonga, -L. 1993. «Biomass production and environmental conditions for raising *Daphnia* with their microalgal food». *Int. Conf. Bordeaux Aquaculture, Bordeaux (France), 25-27 Mar 1992 Production, -Environment-and-Quality. Ghent-Belgium European-Aquaculture-Society*(18): 63-70.

Cowgill, U.M.; Hopkins, D.L.; Applegath, S.L.; Takahashi, I.T.; Brooks, S.D.; Milazzo, D.P. 1985. «Brood size and neonate weight of *Daphnia magna* produced by nine diets». 8° Symposium on Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, Fort Mitchell, KY (USA), 15-17 Apr. 1984. Bahner, R.C.; Hansen, D.J. (eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. Eighth Symposium.* 891: 233-244.

Cox, E.J.; Naylor, C.; Bradley, M.C.; Calow, P. 1992. «Effect of differing maternal ration on adult fecundity and offspring size in laboratory cultures of *Daphnia magna* Straus for ecotoxicological testing». *Aquat. Toxicol.* 24 (1-2): 63-74.

Emmens, C.W. 1974. *How to keep and breed tropical fish*. Brookvale, Australia. T.F.H. Publications, Inc. Ltd. 250 pp.

Martínez-Jerónimo, F.; R.-Villaseñor, C.; G.-Ríos, B.; F. Espinosa, Ch. 1993. «Effect of type and food concentration in survival, longevity, and reproduction of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera)». *World Aquaculture '93 Int. Conf.*, Torremolinos (Spain), 26-28 May 1993.

Martínez-Jerónimo, -F.; Villaseñor, -R.; Ríos, -G.; Espinosa, -F. 1994. «Effect of food type and concentration on the survival, longevity, and reproduction of *Daphnia magna*», *Hydrobiologia*, 287 (2): 207-214.

Ricker, W.E. 1975. «Computation and interpretation of biological statistics of fish populations». *Bull. Fish. Res. Board. Can.*, 191: 382 p.

Sevrin-Reyssac, -J. 1993. «Performances and constraints of intensive rearing of the cladoceran *Daphnia magna* Straus, utilization of produced biomass». 1ª European Crustacean Conf., Paris (France), 31 Aug 4 Sep, 1992. Proceedings of the first European Crustacean Conference, 1992. *Actes de la Premiere Conference Europeenne Sur les Crustaces*, 1992. 64 (3): 357-360.

Sun-Meijuan; Zhang, Yongyuan; Cai, Junpeng. 1991. «Preliminary study of breeding and biology of *Daphnia magna* HB, a high temperature resistant species». *Acta Hydrobiol. Sin. Shuisheng Shengwu Xuebao*. 15 (2): 166-173.

Trubetskova, I.; Lampert, W. 1993. «Egg size and egg mass of *Daphnia magna*: Response to food availability. Cladocera-as Model Organisms in Biology». Larsson, P.; Weider, L. J. (eds.). *Proceedings-of-the-third-International-Symposium-on-Cladocera-held-in-Bergen*, 9-16 August 1993. . 1995 307 (1-3): 139-145.

Yamane, T. 1970. *Statistics; An introductory Analysis*. (Second edition). A Harper International Edition. 919 p.

Yufera, M. y Pascual, E. 1980. «Estudio del rendimiento de cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*», *Hidrobiol. Soc. URSS* pp. 148.