



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**EVALUACIÓN DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DEL ROTÍFERO  
(*Brachionus plicatilis*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO,  
UTILIZANDO DIFERENTES DIETAS.**

Tesis que para obtener el título de

OCEANÓLOGO

presenta: Iván Monay Díaz.

Unidad de Biotecnología en Piscicultura.  
Ensenada BC., junio 2002

EVALUACION DE LA DINAMICA POBLACIONAL DEL ROTIFERO (*Brachionus plicatilis*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO, UTILIZANDO DIFERENTES DIETAS

T E S I S  
QUE PRESENTA:  
IVAN MONAY DIAZ

Aprobada por:

  
MC. CONAL DAVID TRUE  
Presidente del Jurado

  
Dr. LUS MERCEDES LOPEZ ACUÑA  
Sinodal Propietario

  
Dr. MARIA TERESA VIANA CASTRILLON  
Sinodal Propietario

## RESUMEN

Se trabajó con el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*, en 2 etapas experimentales y una prueba piloto. Los 2 experimentos consistieron en cultivar rotíferos durante 24 días en volúmenes de 2 a 8 litros utilizando 5 dietas por experimento, las cuales se dividieron en 3 tipos de alimento: *Nannochloropsis sp.* alimento vivo, células de microalgas inertes (pastas) (*Nannochloropsis oculata* y *Pavlova pinguis*) y alimento balanceado artificial (Rotimac y Microfeast), con algunas combinaciones entre ellas; con el fin de sustituir el alimento vivo de rotífero. Donde se probó que la microalga viva fue superior a las otras dietas con un promedio de 208 rotíferos por mililitro, durante los periodos de cosecha en los 24 días de cultivo. En la prueba piloto, se describió la dinámica poblacional con cultivos masivos en volúmenes de 400 litros; utilizando implementos en los estanques de cultivo, los cuales permitieron obtener un promedio de 492.29 rotíferos ml<sup>-1</sup>, además de cosechar diariamente 147.6 millones de rotíferos diariamente, logrando así optimizar y eficientizar el cultivo de rotíferos.

*A mis padres:*

*David y Lucia.*

*A mis hermanos:*

*David, Guadalupe y Gerardo.*

## AGRADECIMIENTOS:

*Muchas gracias a la Universidad Autónoma de Baja California por el apoyo brindado a través de la Facultad de Ciencias Marinas.*

*A todo el personal: docente y administrativo de la facultad.*

*Al M.C. Conal David True (el mejor jefe que he tenido), vieras que bien me sirvieron tus enseñanzas. Muchas gracias por que siempre me apoyaste cuando más lo necesitaba. Además de brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis.*

*A la Dra. Lus López, por tu dedicación e interés todo este tiempo que trabajamos juntos, en la elaboración de este trabajo y en general en el laboratorio.*

*A la Dra. Tere Viana, por tu tiempo, sugerencias y comentarios, sin eso no hubiera podido terminar.*

*Al Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza, por el apoyo a través del convenio # A1-1-99/020: Programa piloto de repoblamiento de totoaba, "una especie en peligro de extinción".*

*Al instituto Hubbs, ya que trabajé con sus bichos.*

*A la gran familia totoaba: Conal, Gerardo, Eduardo, Lus, Samuel, Abisai, Fidel, Miguel, Vane, Gardenia, Moisés, Magui y todos los demás.*

*A Miguel Ángel por su apoyo en la realización de los experimentos.*

*A Marco Bravo, por traerme los tornillos que me hacían falta.*

*A la raza, que no por estar al último es menos importante: Enrique (compadre), Sachiko, Rocío, Vero, Miguel (Zorrilla), Jesús (Palas), Nirari, Aube, Raúl, Ana, Yee, Raza Reltop, Los Pólipos, Brenda, Juan Carlos (padrino), Santiago (santos), Carolina (canica), Mirnah (súper mamá), Chacha, Alex (chino), Mariana, Lizeth, Victor (Anguiano y familia) y a todos los súper compas que aquí están también, pero comprendan ... son las 2:30 am y tengo que entregar esto mañana temprano.*

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	2
1.2 Antecedentes	4
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo general	8
2.2 Objetivos particulares	8
3. MATERIALES Y MÉTODO	9
3.1 Análisis de la dinámica poblacional utilizando diferentes dietas	9
3.1.1 Organismos utilizados	9
3.1.2 Cultivos	10
3.1.3 Evaluación de la dinámica poblacional (muestreo)	15
3.1.4 Estadística	15
3.2 Seguimiento y descripción de la población en cultivos masivos	17
3.2.1 Cultivos	17
3.2.2 Muestreo	22
3.2.3 Cosechas	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Análisis de la dinámica poblacional utilizando diferentes dietas	23
4.1.1 Rotíferos por mililitro	25
4.1.2 Hembras por mililitro	28
4.1.3 Fecundidad	30
4.1.4 Factores fisicoquímicos	32
4.2 Seguimiento y descripción de la población en cultivos masivos	34
4.2.1 Densidad poblacional y producción diaria	34
4.2.2 Parámetros fisicoquímicos del medio de cultivo	39
5. DISCUSIONES	42
5.1 Experimentos 1 y 2: cultivos con diferentes dietas	42
5.1.1 Densidad poblacional	42
5.1.1.1 Rotíferos por ml	42
5.1.1.2 Hembras por ml y fecundidad	42
5.1.2 Factores fisicoquímicos	46
5.2 Autoescalación del cultivo de rotíferos en volúmenes de 400 litros	47
5.2.1 Densidad poblacional	47
5.2.2 Alimentación	49
5.2.3 Parámetros fisicoquímicos y sistemas de cultivo	51
6. CONCLUSIONES	54
7. BIBLIOGRAFÍA	55

Tabla

LISTA DE TABLAS

Pág.

1	Identificación, clasificación y porción diaria de las dietas que se utilizaron durante el cultivo	14
2	Promedios, medianas y ranqueo de Kruskal-Wallis [H ( 9, N= 180) = 47.99737 p ≤.05] de rotíferos por ml de cada dieta durante los 24 días de cultivo.	27
3	Promedios, medianas y ranqueo de Kruskal-Wallis [H ( 9, N= 180) = 47.99737 p ≤.05] de hembras por mililitro de cada dieta durante los 24 días de cultivo.	30
4	Promedios, medianas y ranqueo de Kruskal-Wallis [H ( 9, N= 180) = 47.99737 p ≤.05] de la fecundidad de cada dieta, durante los 24 días de cultivo.	32
5	Promedio de la temperatura de los cultivos en cada dieta	33
6	Promedio de pH en los cultivos para cada dieta	33
7	Comportamiento de los parámetros fisicoquímicos durante el periodo de cultivo	39
8	Comparación del suministro de alimento entre los 2 experimentos	50

Figura	LISTA DE FIGURAS	Pág.
1	Ciclo reproductivo del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> .	3
2	Cultivo semicontínuo de cuatro días.	11
3	Cosecha de organismos para iniciar un nuevo ciclo de cultivo.	13
4	Estanque de cultivo de 430 litros de capacidad.	18
5	El cosechador.	20
6	a) Recipiente con la solución de microalgas. b) El aire proviene de la línea abastecedora general de aire del laboratorio, produciendo presión (controlada por una llave) en el recipiente.	21
7	Rotíferos por mililitro en los días de cosecha durante el periodo de cultivo.	24
8	Promedios de rotíferos por mililitro en los días de cosecha durante el periodo de cultivo en los experimentos a) uno y b) dos.	26
9	Promedios de hembras por mililitro en los días de cosecha durante el periodo de cultivo en los experimentos a) uno y b) dos.	29
10	Promedios de la variable Fecundidad en los días de cosecha durante el periodo de cultivo en los experimentos a) uno y b) dos.	31
11	Promedio diario de rot $\text{ml}^{-1}$ en las cuatro columnas durante los 11 días de cultivo	35
12	Sumatoria de la cosecha (producción) diaria de rotíferos de las cuatro columnas durante los 11 días de cultivo.	37
13	Promedio diario de hembras por mililitro en las cuatro columnas durante los 11 días de cultivo.	38
14	A). Variación y comportamiento de la temperatura ( $T^{\circ}\text{C}$ ), B) del amonio ( $\text{NH}_4$ ), C) del oxígeno ( $\text{O}_2$ ) y del D) pH. Durante los 11 días de cultivo.	40

## 1 INTRODUCCIÓN

El uso de rotíferos como alimento vivo es indispensable en el cultivo de la mayoría de larvas de peces, moluscos y crustáceos. Algunas características de los rotíferos como alimento vivo son: su tamaño pequeño (100-300  $\mu\text{m}$ ), nado lento (esto hace que las larvas puedan capturarlo fácilmente), rápida reproducción (que le permite duplicar la población en 24 h), rangos amplios de tolerancia a la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto; lo que ha llevado a que sea el principal alimento utilizado en el cultivo de larvas de peces (Snell y Carrillo, 1984; Hagiwara *et al.*, 1997; Pousão *et al.*, 1997; Reitan *et al.*, 1997; Tocher *et al.*, 1997; Yoshimura *et al.*, 1997).

En la Unidad de Biotecnología en Piscicultura se utiliza a los rotíferos como opción ideal para alimentar a la primera etapa larvaria de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*), a partir del momento en el cual abre completamente la boca (a las 46.3 horas después de eclosión, 2.5 mm de longitud) (Morales, 1999), hasta el momento en que se alimenta con nauplios de *Artemia salina* (193 horas después de eclosión, más de 5.21 mm de longitud) (Sandoval en proceso).

Los rotíferos son animales acuáticos microscópicos que pertenecen al phylum Rotifera, el cual consta de más de 1500 especies descritas, donde la

mayoría vive en agua dulce (Barnes, 1990). En general, los rotíferos miden de setenta a mil micras, tienen una corona ciliar característica en el extremo anterior, poseen un tracto digestivo completo, pseudo celoma, sistema excretor, sistema nervioso con cerebro y órganos de los sentidos (Ville, 1992).

Existen mucha especies de rotíferos, donde el rotífero *Brachionus plicatilis*, pertenece al orden Ploima que a su vez pertenece a la clase Monogononta (Barnes, 1990). *B. plicatilis* se puede reproducir tanto en forma sexual como asexual, característica reproductiva de su clase. Cuando las condiciones ambientales son favorables para el rotífero, la hembra puede producir huevos diploides que al desarrollarse producen hembras; y bajo condiciones desfavorables, la hembra produce huevos haploides. Los huevos haploides no fertilizados se convierten en machos, y si se fertilizan, se producen huevos diploides, los cuales se pueden enquistar y al eclosionar se convierten en hembras (Barnes, 1990) (Figura 1). Es importante entender y controlar los estímulos que producen el cambio de reproducción de los rotíferos, ya que eso influye sobre la dinámica poblacional.

## 1.1 Justificación

Probando alternativas al alimento vivo, se busca una simplicidad en el cultivo del rotífero *B. Plicatilis*. Es por esto que se realizaron cultivos con

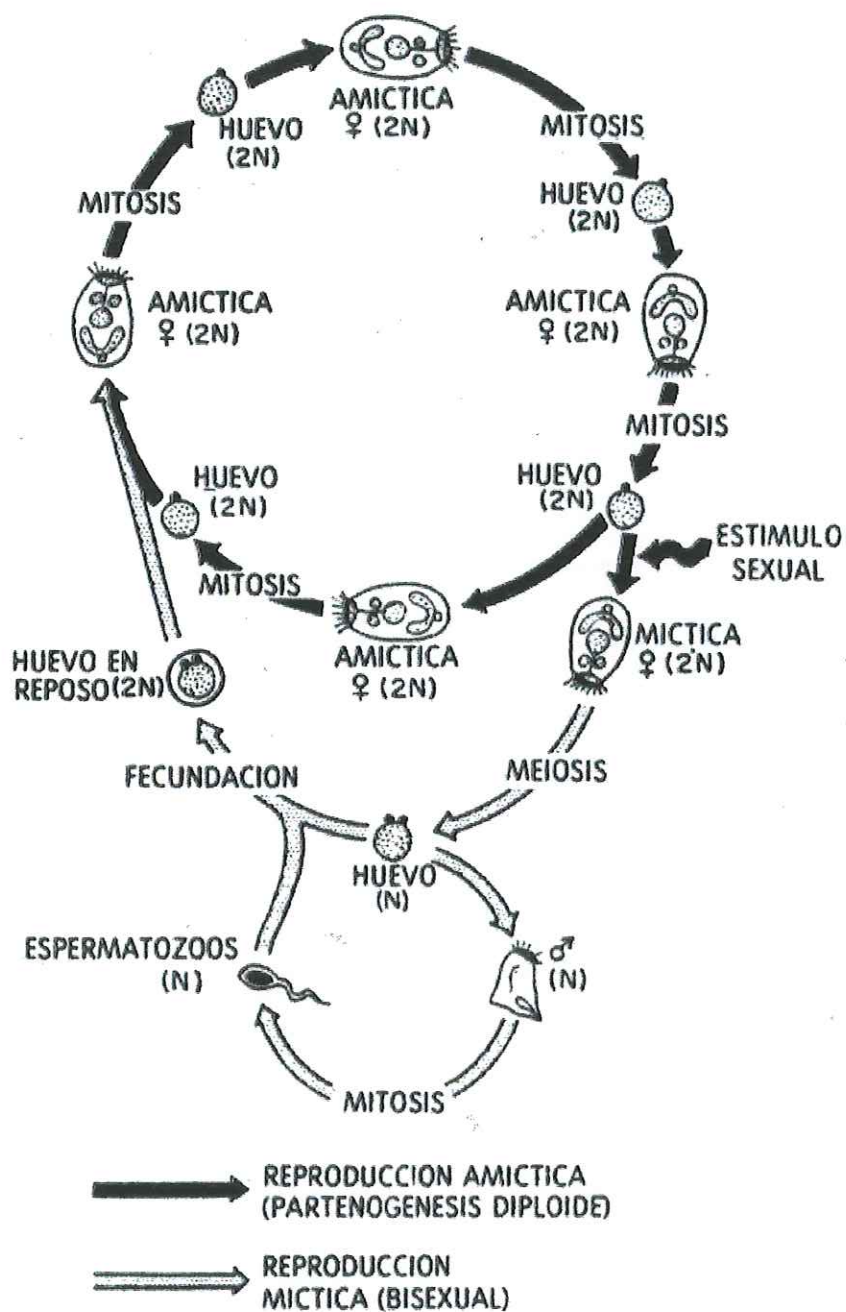


Figura 1. Ciclo reproductivo del rotífero *Brachionus plicatilis*. La reproducción amíctica del rotífero siempre ocurre, excepto cuando las condiciones fisicoquímicas del agua desfavorecen al rotífero o existe escasez de alimento, entonces se produce la reproducción bisexual.

diferentes dietas, donde se utilizaron 2 tipos de alimentos inertes: alimento balanceado y microalgas en pasta; además de utilizar *Nannochloropsis sp.* viva.

También, la Unidad en Biotecnología en Piscicultura (UBP) tiene la necesidad de intensificar el cultivo de rotíferos para poder sustentar las necesidades de la. Se necesitan de 160 millones de rotíferos diarios durante 9 días, dos veces al año, para poder mantener las instalaciones de la UBP al límite superior de capacidad de carga, es por esto que se quiere describir la dinámica poblacional en cultivos masivos en estanques de 400 litros durante 11 días, probando innovaciones en el cultivo de rotíferos.

## 1.2 Antecedentes

Los rotíferos han sido utilizados como alimento vivo desde hace más de 30 años (Hagiwara *et al.*, 1997). Desde entonces hasta la fecha se han realizado estudios de comportamiento, fisiología, parámetros fisicoquímicos del medio de cultivo, cultivos con diferentes tipos de microalgas, cultivos con dietas balanceadas, cultivos masivos y últimamente se trabaja con producción de huevos de reposo (quistes) (Lubzens, *et al.*, 1995; Rueda, 1996; Øie, *et al.*, 1997; Maruyama, *et al.*, 1997; Pousão, *et al.*, 1997; Yoshimura, *et al.*, 1997; Chebil y Yamasaki, 1998; Navarro y Yufera, 1998 a y b). Mientras que otros estudios se refieren al tipo de cultivos de rotíferos

utilizando diferentes niveles de temperatura, salinidad y pH, los cuales, van de 20 a 30 °C para la temperatura, de 18 hasta 36 ppm de salinidad y de 7.0 a 8.0 para pH (*op. cit.*).

La dinámica poblacional del rotífero se puede predecir por medio de la razón del huevo (número de huevo sobre rotíferos) y la velocidad de nado (mm sobre min), de tal forma que nado lento y poca producción de huevos resulta en una pobre producción de organismos, información que puede ayudar a prevenir el colapso de la población en los cultivos (Korstad *et al.*, 1995).

Las microalgas vivas son utilizadas como alimento debido a su eficiencia. Sin embargo, la proporción de eficiencia-costo y eficiencia-esfuerzo de producción, han obligado al acuicultor a buscar otras opciones para su alimentación como son: levaduras, microalgas en polvos, microalgas liofilizadas, microalgas criopreservadas (las cuales son microalgas centrifugadas y concentradas de manera que les da una apariencia de pasta), microencapsulados y microesferas lipídicas (Robert y Trintignac, 1997).

Buscando una mayor eficiencia en el cultivo de *B. plicatilis*, Rueda (1996) probó 3 microalgas y una cianobacteria deshidratada como alimento para el cultivo de cepas de *B. plicatilis*, donde la mejor opción la dio la

microalga *Nannochloris sp.* produciendo 233.4 rotíferos por ml, seguida por *Nannochloropsis sp.* con 193 rotíferos por ml promedio. También se ha trabajado con *Nannochloropsis sp.* liofilizada (Sommer *et al.*, 1990; Lubzens *et al.*, 1995; Yúfera y Navarro, 1995; Navarro y Yúfera, 1998b; Navarro, 1999), y se han utilizado enriquecedores como tejidos neuronales de pescado (Tocher *et al.*, 1997), ya que el fin es optimizar aún más el cultivo de rotíferos utilizando dietas que simplifiquen el trabajo evitando el cultivo de microalgas y su costo alto.

Los alimentos como concentrados comerciales (que en este trabajo se le nombraron como dietas balanceadas), consisten en partículas de nutrientes en contacto directo con el medio de cultivo (Hino, 1993). Los cuales, son utilizados debido a su utilización práctica.

También se tienen a las microalgas en pasta o microalgas criopreservadas. El uso de microalgas en pasta, así como cualquier otra alternativa al alimento vivo, reduce de manera significativa el esfuerzo de trabajo en la producción de rotíferos, ya que se evitan los cultivos de microalgas. Con el uso de microalgas en pasta el deterioro del medio de cultivo es menor que con el uso de dietas balanceadas o el uso de levaduras (Hagiwara *et al.*, 1997), ya que la misma pared celular, de la microalga, no permite que haya un contacto directo con el medio de cultivo (de materia orgánica que pueda afectar al mismo medio). Las células inertes en

cualquier dieta de microalgas en pasta presentan todas las características nutricionales de las células vivas (Sommer *et al.*, 1990), pero al no tener movilidad propia, tienden a sedimentarse.

El cuello de botella para el cultivo intensivo de larvas de peces de boca pequeña, se encuentra en sus primeros días de alimentación; las grandes ventajas que ofrece el rotífero (mencionadas al principio del capítulo), lo han llevado a ser el primer alimento para las larvas de peces más ampliamente utilizado en la acuicultura (Lubzens *et al.*, 1995). Es por esto que el presente trabajo muestra la posibilidad de implementar un sistema que permita intensificar y simplificar el cultivo de rotíferos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

- Evaluar la dinámica poblacional del rotífero *Brachionus plicatilis*, en cultivos discontinuos de 8 litros utilizando diferentes dietas: microalgas vivas, criopreservadas y 2 dietas balanceadas; además evaluar con una sola dieta la dinámica poblacional a nivel masivo en cultivos de 400 litros.

### 2.2 Objetivos particulares

- Encontrar la dieta óptima para el cultivo en laboratorio del rotífero *B. plicatilis*, con relación a la infraestructura instalada en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP), evaluada con la densidad poblacional (rotíferos por mililitro).
- Hacer un seguimiento de la dinámica poblacional del cultivo masivo de rotíferos en estanques de 400 litros.

### 3 MATERIALES Y MÉTODO

Se realizaron dos experimentos y una prueba piloto; donde, en los experimentos, se analizó la dinámica poblacional del rotífero *Brachionus plicatilis* cultivado con diferentes dietas. En la prueba piloto se logró hacer una autoescalación de un cultivo de rotíferos en recipientes de 400 litros utilizando solo una de las dietas de los primeros dos experimentos.

#### 3.1 Análisis de la dinámica poblacional utilizando diferentes dietas

##### 3.1.1 Organismos utilizados

Se trabajó con el rotífero *B. plicatilis* (O.F. Müller:1786) del tipo L. Los rotíferos se tomaron de la cepa general de la UBP, la cual se mantuvo con microalgas vivas (*Nannochloropsis sp*) y que a su vez, fue obtenida de la cepa del instituto *Hubbs Sea World Research Institute* en San Diego Ca. USA.

### 3.1.2 Cultivos

Se realizaron dos experimentos, debido a falta de infraestructura para cultivar las 10 dietas al mismo tiempo. Se probaron 5 dietas en cada experimento con 3 réplicas por dieta. Los cultivos tuvieron una duración de 24 días, por el método discontinuo descrito por Lubzens et al.(1997), con la modificación de este caso en particular que los ciclos son de 4 días.

Los cultivos se realizaron en bolsas de plástico con capacidad de 10 litros, utilizando volúmenes de 2, 4, 6 y 8 litros (Figura 2). Se manejó una salinidad de 22 ppm mediante la dilución de agua de mar con agua dulce (3:1). El agua de mar se tomó de la Bahía de Todos Santos y se filtró a 40  $\mu\text{m}$  con un filtro de tambor Hydrotech®, después a 2  $\mu\text{m}$  con un filtro de tierra de diatomitas Jacuzzi®, por último, el agua de mar, se pasó por un esterilizador de luz ultravioleta (Mega-UV) Aquanetics®. El pH se controló diariamente, ajustándolo manualmente con HCl ó NaOH una vez al día a 7.5 utilizando un controlador pH/ORP Cole Parmer® modelo 5656-00, con un electrodo Cole Parmer® modelo 05994-26. Para mantener la temperatura constante el laboratorio contó con temperatura controlada a 27 °C. Los cultivos se airearon desde el fondo de manera continua. Para mantenerlos con luz constante, se utilizaron lámparas fluorescentes de luz de día con una intensidad de 40 W 10 s<sup>-1</sup>.

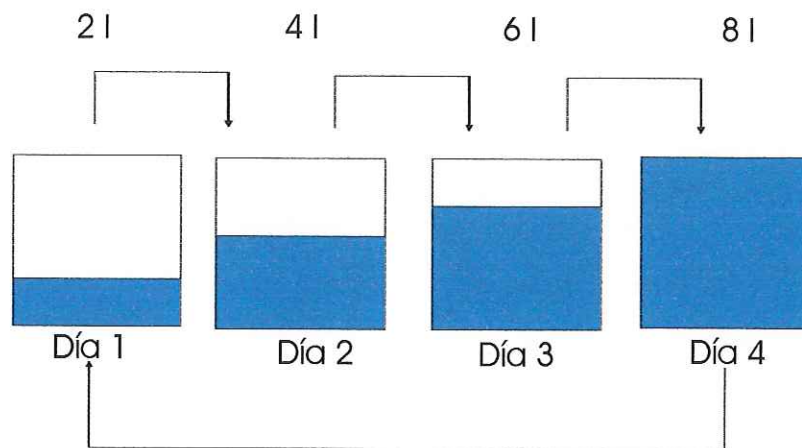


Figura 2. Cultivo semicontinuo de cuatro días. En el primer día se tienen 2 litros de medio, a los cuales se les agrega otros 2 litros. En los días 2 y 3, el procedimiento es el mismo que en el día 1. En el día 4, se cosecha la bolsa y se toman los rotíferos necesarios para iniciar un ciclo nuevo.

En el día 1, cada cultivo se inoculó con una densidad de 150 rotíferos  $\text{ml}^{-1}$ . Diariamente se le monitorearon los parámetros antes mencionados, además de su dinámica poblacional (se explicará más adelante), y se les agregaron 2 litros de medio de cultivo con alimento (Figura 2). Aunque el monitoreo fue diario, solo nos enfocamos a los días de cosecha.

Cada cuatro días, se eliminó el excedente de organismos (hasta una concentración de 150 rotíferos  $\text{ml}^{-1}$ ) y se inició un cultivo nuevo, como se describe en el párrafo anterior, así se repitió hasta cumplir 24 días (6 ciclos de cultivo). Las cosechas de los organismos en cada fin de ciclo, se tamizaron con una malla de 40  $\mu\text{m}$  (Figura 3), de ahí se tomaron los organismos que se utilizaron para iniciar un nuevo ciclo.

Las dietas utilizadas fueron: microalgas vivas (*Nannochloropsis sp*) proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), microalgas en pasta (*Pavlova pinguis* y *Nannochloropsis oculata*) compradas en *Instat Algae*®, dietas balanceadas: Rotimac (Bio-Marine® de la empresa Aquafauna) y Microfeast (Microfeast Feeds Division Burns Philp Food Inc.) y algunas combinaciones entre ellas (Tabla 1). Las dietas y las porciones diarias de alimento que se suministraron se muestran en la Tabla 1, así como las dietas correspondientes a cada experimento.



Figura 3. Cosecha de organismos para iniciar un nuevo ciclo de cultivo. Se toman los rotíferos de una bolsa de fin de ciclo (día 4) y se concentran en un tamiz, donde se enjuagan con agua de mar. Se vierten en un recipiente de 3 litros donde se cuantifican y se seleccionan para colocarlos en una bolsa nueva.

Tabla 1. Identificación, clasificación y porción diaria de las dietas que se utilizaron durante el cultivo.

CLAVE Gpo. A	TIPO DE ALIMENTO	DIETA	PORCIÓN DIARIA DE ALIMENTO
NAP	Criopreservada	Nannochloropsis oculata en pasta	18x10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup>
PAP	Criopreservada	Pavlova pinguis en pasta	8.9x10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup>
NAP7525PAP	Criopreservada Y	Nannochloropsis oculata en pasta Y	13.5x10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup> Y
	Criopreservada	Pavlova pinguis en pasta	2.2x10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup>
NAP-RC	Criopreservada Y	Nannochloropsis oculata en pasta Y	13.5x10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup> Y
	Alimento artificial	Rotimac	1.12x10 <sup>-4</sup> g ml <sup>-1</sup>
RC	Alimento artificial	Rotimac	1.5x10 <sup>-4</sup> g ml <sup>-1</sup>

CLAVE Gpo. B	TIPO DE ALIMENTO	DIETA	PORCIÓN DIARIA DE ALIMENTO
NAV	Alimento vivo	Nannochloropsis sp. viva	18x10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup>
NAP8515PAP	Criopreservada Y	Nannochloropsis oculata en pasta Y	15.3x10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup> Y
	Criopreservada	Pavlova pinguis en pasta	1.3x10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup>
NAP-MF	Criopreservada Y	Nannochloropsis oculata en pasta Y	13.5x10 <sup>6</sup> cel ml <sup>-1</sup> Y
	Alimento artificial	Microfeast	1.12x10 <sup>-4</sup> g ml <sup>-1</sup>
MF	Alimento artificial	Microfeast	1.5x10 <sup>-4</sup> g ml <sup>-1</sup>
RC 2	Alimento artificial	Rotimac	3.0x10 <sup>-4</sup> g ml <sup>-1</sup>

Se trató de mantener una porción equivalente con base en la ración diaria de los diferentes tratamientos. Para las combinaciones de dietas (Tabla 1) se consideraron los siguientes porcentajes de alimento diario: *Nannochloropsis oculata* 75% con *Pavlova pinguis* 25% (NAP7525PAV), *N. oculata* 85% con *P. pinguis* 15% (NAP8515PAV), *N. oculata* 75% y Rotimac 25% (NAP-RC) y *N. oculata* 75% y Microfeast 25% (NAP-MF).

### 3.1.3 Evaluación de la dinámica poblacional (muestreo)

La evaluación de la dinámica poblacional se realizó mediante conteos, donde se utilizó un microscopio estereoscópico Meiji modelo EMZ-TR y los organismos se fijaron con lugol. Cada día de experimentación, se tomaron tres muestras de cada réplica, y se estimó: número de rotíferos por mililitro ( $\text{rot ml}^{-1}$ ), número de hembras con huevo por mililitro ( $\text{hrm ml}^{-1}$ ), número de huevos por rotífero (fecundidad), ausencia y presencia de protozoarios.

### 3.1.4 Estadística

Se obtuvieron promedios de 24 días de cultivo de las 5 dietas por experimento. Los promedios fueron de las variables de rotíferos  $\text{ml}^{-1}$ , hembras  $\text{ml}^{-1}$  y fecundidad; los cuales, son de los triplicados de cada dieta y se compararon las dietas en 2 grupos. Los datos se procesaron con el

programa STATISTICA 5.5 y después de hacer los análisis de normalidad, se decidió tratar los datos con una prueba ANOVA de una vía de rangos y medianas de Kruskal-Wallis, debido a que algunos de los datos resultaron no paramétricos. Las comparaciones estadísticas se hicieron entre los grupos experimentales y las comparaciones entre todas las dietas se hicieron de forma gráfica y verbal.

Los datos de rotíferos  $\text{ml}^{-1}$  fueron el promedio de los rotíferos contados en tres mililitros. Las hembras  $\text{ml}^{-1}$  fueron el promedio de aquellos rotíferos que presenten un huevo o más. Los datos de fecundidad (huevos  $\text{rotíferos}^{-1}$ ) se obtuvieron de dividir el número de huevos entre el número total de rotíferos (con o sin huevo).

## 3.2 Seguimiento y descripción de la población en cultivos masivos

### 3.2.1 Cultivos

Se realizaron cultivos discontinuos de 4 días, durante un periodo de 11 días (3 ciclos de cultivo), de manera similar a los cultivos para la evaluación de la dinámica poblacional, con las modificaciones que se explican más adelante y que convierten al cultivo en un híbrido entre un sistema discontinuo con uno semicontinuo. Se cultivaron rotíferos en volúmenes de 400 litros en 4 estanques cilíndricos de fibra de vidrio con fondo cónico, con capacidad para 430 litros (Figura 4a).

Cada estanque contó con un sistema de recirculación (SR), el cual remueve las partículas suspendidas, recircula el medio de cultivo y provee al medio de una oxigenación extra. El sistema SR tiene un *airlift* externo al estanque y un cedazo en la parte superior interna (Figuras 4a y b). El *airlift* recirculó el medio de cultivo desde el fondo y lo vertió en el cedazo, el cual, contó con un filtro de guata sintética de poliéster que permitió el paso a los rotíferos y retuvo a la mayoría de las partículas suspendidas superiores a  $260\ \mu\text{m}$  (Figura 4b).



Figura 4. Estanque de cultivo de 430 litros de capacidad. A) El tubo de PVC que se encuentra al lado del estanque es un *airlift*, el cual se encarga de recircular el medio de cultivo. B) En la segunda columna (de enfrente para atrás) se observa el recipiente azul con la guata sintética, es el cedazo donde se atrapan las partículas suspendidas.

En este caso, las condiciones ambientales de luz y temperatura fueron las mismas que en los cultivos donde se evaluó la dinámica poblacional con diferentes dietas. La densidad de rotíferos se mantuvo, desde el primer inóculo en los cuatro estanques, a 400 rotíferos  $\text{ml}^{-1}$ , los rotíferos excedentes se cosecharon diariamente mediante un cosechador construido para este propósito (Figura 5). Además se renovó el cincuenta por ciento del agua diariamente.

Los cultivos se realizaron con *N. oculata* en pasta (*Instat Algae*®), la cantidad de microalgas fue suministrada basándose en la densidad de rotíferos, proporcionando  $9.8 \times 10^4$  células de microalgas  $\text{rotífero}^{-1} \text{ día}^{-1}$ . La ración diaria de alimento se suministró mediante goteo a una razón de 0.05  $\text{ml s}^{-1}$  durante un periodo de 20 h. El goteo provino de una botella de vidrio colocada dentro de un contenedor frío (alimentador). En el alimentador se le puso la ración diaria de microalgas, diluida en 4 litros de agua de mar. En la tapadera del alimentador se instalaron dos mangueras, la primera proporcionó aire a presión, y la segunda llevó el alimento hasta los estanques (Figuras 6a y b).

Diariamente, al terminar el periodo de alimentación por goteo, se tomaron cuatro muestras (dos del fondo y dos de la superficie) y se analizó: rotíferos  $\text{ml}^{-1}$ , hembras con huevo  $\text{ml}^{-1}$  y huevo  $\text{rotífero}^{-1}$ . Además se midieron los parámetros fisicoquímicos del medio: pH (controlador pH/ORP

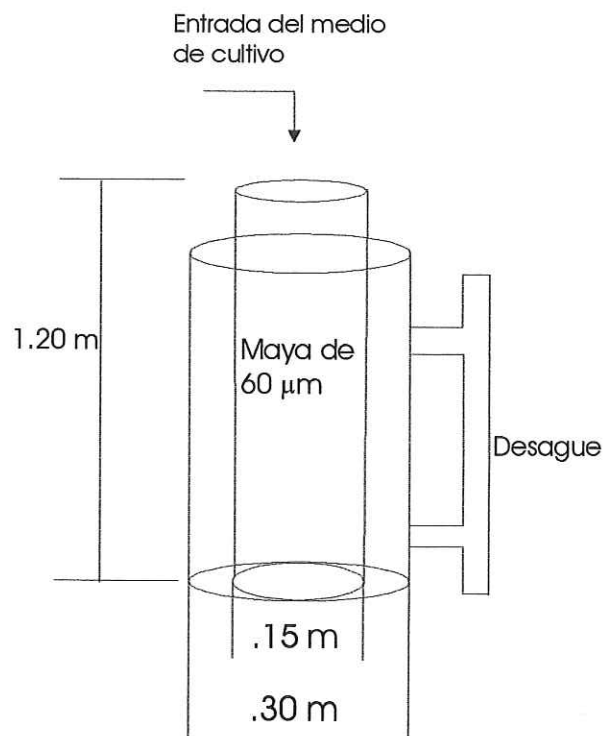


Figura 5. El cosechador, es un cilindro de pvc de aproximadamente 0.30 m de diámetro y de 1.20 m de alto, tiene en medio un soporte donde se coloca la malla de 60  $\mu\text{m}$  que forma un cilindro interno de 0.15 m de diámetro, donde se retiene a los rotíferos.

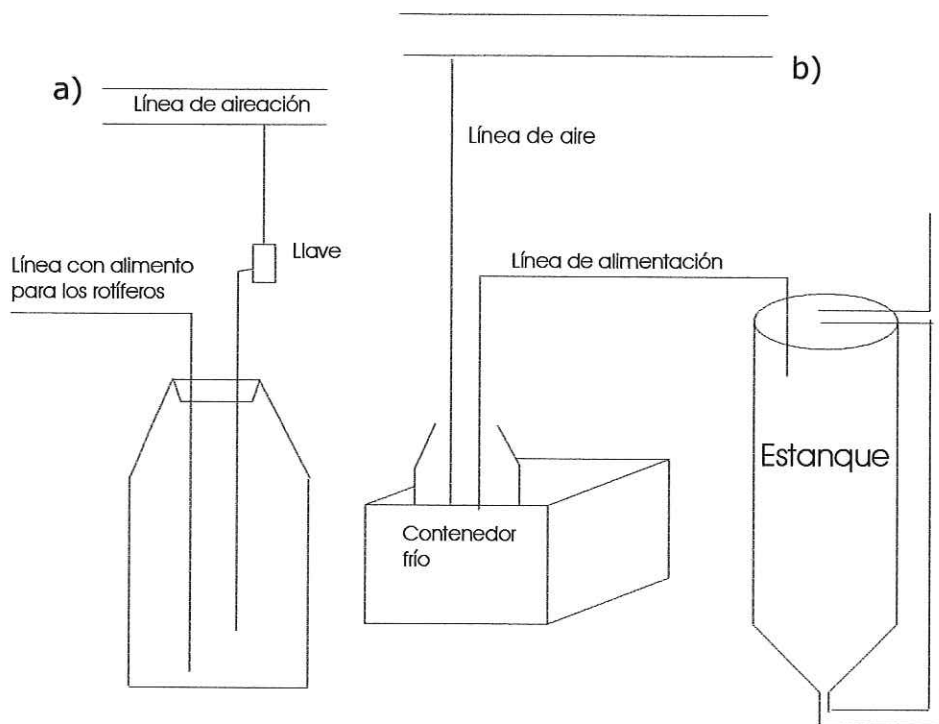


Figura 6a y b. a) Recipiente con la solución de microalgas. b) El aire proviene de la línea abastecedora general de aire del laboratorio, produce presión (controlada por una llave) en el recipiente. El alimento sale por una segunda línea y va directo al estanque.

Cole Parmer® modelo 5656-00, con un electrodo Cole Parmer® modelo 05994-26), T °C (termómetro de mercurio con precisión de 0.1°C), NH<sub>4</sub> (analizador de iones Orion® 1260, con un electrodo Orion® 95-12) y O<sub>2</sub> (oxímetro YSI modelo 57).

### 3.2.2 Muestreo

Los muestreos se realizaron de la superficie de los estanques y desde el fondo; las muestras del fondo se colectaron por medio del sistema de recirculación (SR).

### 3.2.3 Cosechas

Todos los días, después del conteo y medición de los parámetros de cultivo, se procedió a separar los organismos excedentes de los cultivos.

Tanto la cosecha como el recambio de agua se realizaron con un cosechador con luz de malla de 60 µm (Figura 5). Para mantener una densidad estándar durante los tres ciclos de cultivo, se eliminaron los rotíferos excedentes de 400 rotíferos ml<sup>-1</sup>.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análisis de la dinámica poblacional utilizando diferentes dietas.

Debido a que los cultivos fueron discontinuos y se manejaron solo los datos de los días de cosecha (cada 4 días), no es posible distinguir una curva de crecimiento mostrando fases de: latencia, crecimiento exponencial, estacionaria y declive. De hecho, la dinámica poblacional de algunas dietas muestra oscilaciones variables y patrones de comportamiento totalmente diferentes entre ellas (Figura 7).

Después de hacer los análisis de normalidad, se encontró que algunos de los tratamientos contienen datos normales y otros no normales, es por esto que se decidió tratar los datos con una prueba ANOVA de rangos y medianas de Kruskal-Wallis, con la cual se demostró que si hay diferencia significativa entre los días de cosecha en las distintas dietas para todas las variables independientes ( $p \leq .05$ ).

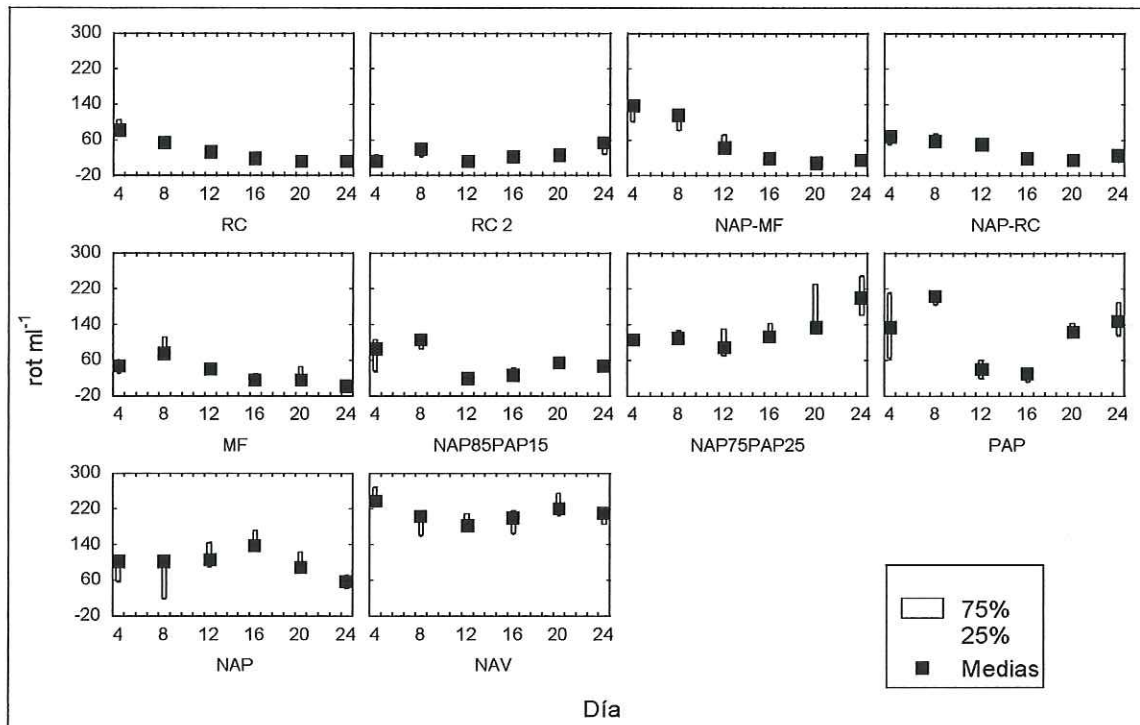


Figura 7. Rotíferos por mililitro en los días de cosecha durante el periodo de cultivo.

#### 4.1.1 Rotíferos por mililitro

En la figura 7 se puede observar cómo las dietas: Rotimac (RC), Rotimac 2 (RC 2), *N. oculata* en pasta con Microfeast (NP-MF), *N. oculata* en pasta con Rotimac (NAP-RC) y Microfeast (MF); muestran un comportamiento muy similar en su dinámica poblacional, se observa claramente como al llegar al día 12 de cultivo, la concentración de organismos tiende a decaer y se mantiene en concentraciones bajas a 60 rot ml<sup>-1</sup>.

En rotíferos por ml (rot ml<sup>-1</sup>), tenemos que nuestro control *Nannochloropsis sp. viva* (NAV) mostró los valores con mayor densidad de organismos, teniendo como promedio 208.45 rot ml<sup>-1</sup> durante los 24 días de cultivo (Tabla 2, grupo b) (Figura 8). Esta densidad es mayor a la que se esperaba inicialmente, debido a que los inóculos se realizaron a 150 rot ml<sup>-1</sup>.

La dieta que mostró los valores más bajos en densidad de población fue Rotimac 2 (RC 2). Donde el promedio final de los 24 días de cultivo fue de 25.75 rot ml<sup>-1</sup>, esto es menor al 20% de organismos inoculados inicialmente (Tabla 2, grupo b).

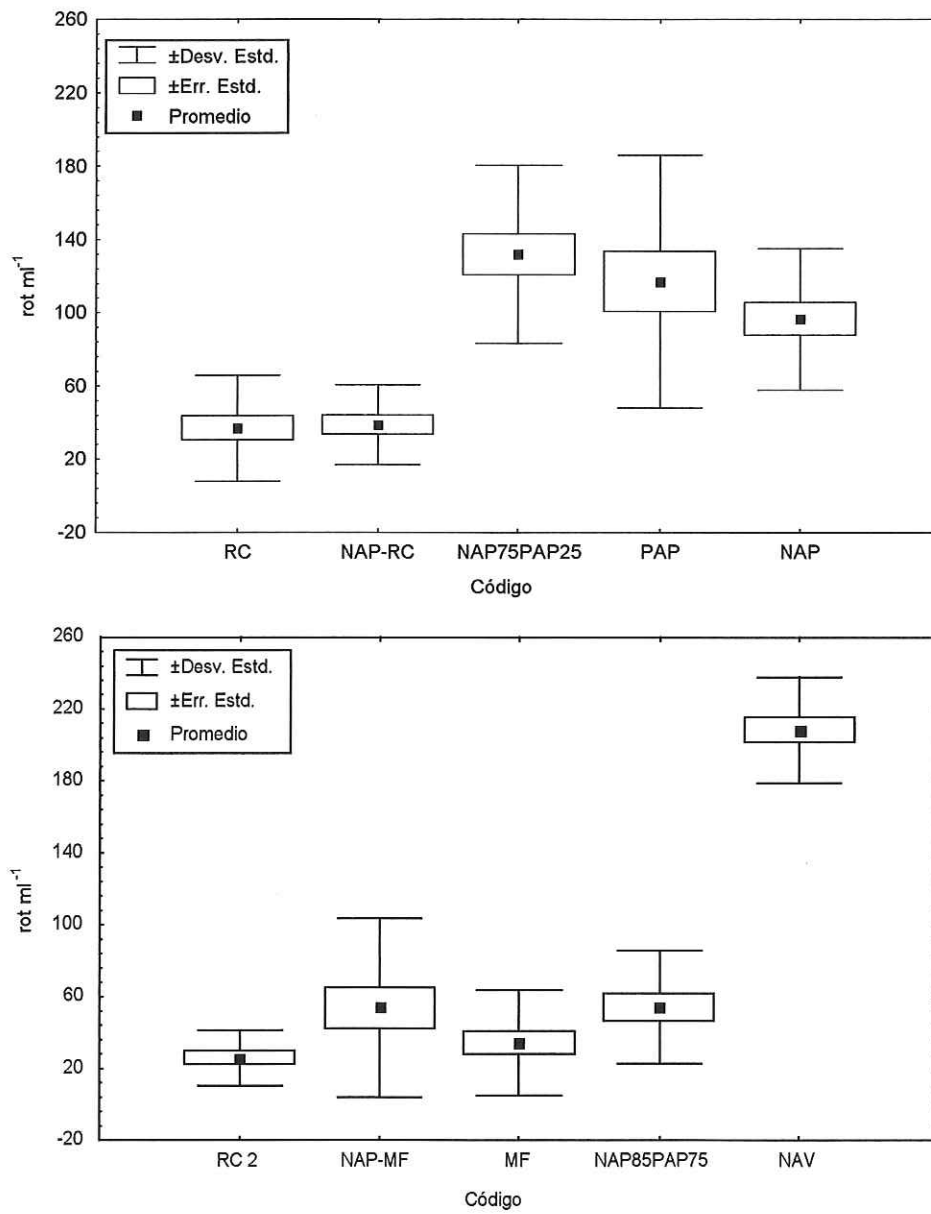


Figura 8. Promedios de rotíferos por mililitro en los días de cosecha durante el periodo de cultivo en los experimentos a) uno y b) dos.

Tabla 2. Promedios, medianas y ranqueo de Kruskal-Wallis [ $H(9, N=180) = 47.99737$   $p \leq .05$ ] de rotíferos por ml de cada dieta durante los 24 días de cultivo.

GRUPO A	PROMEDIOS	MEDIANAS	SUMA DE RANGOS
RC	37.01	26.66	1017.5
NAP-RC	39.44	40.66	1153.0
NAP	96.44	101.83	2088.0
PAP	112.90	121.99	2108.5
NAP75PAP25	131.90	115.33	2457.0

GRUPO B	PROMEDIOS	MEDIANAS	SUMA DE RANGOS
RC2	25.75	22.33	818.0
MF	34.47	31.33	962.5
NAP-MF	53.82	29.00	1225.0
NAP85PAP15	54.34	46.16	1445.0
NAV	208.45	208.66	3015.5

Los rotíferos alimentados con Microfeast (MF), no alcanzaron a completar el periodo de cultivo, de hecho en dos de las tres réplicas se murieron todos los rotíferos para el tercer día del último ciclo de cultivo (día 23). Sin embargo, se obtuvo un promedio de  $34.47 \text{ rot ml}^{-1}$  mayor que RC 2 (Figura 8 b).

Con los promedios de los días de cosecha (Figuras 8a y b), y con la ayuda de la comparación por rangos de Kruskal-Wallis (Tabla 2), las dietas se dividieron en dos subgrupos para ambos experimentos. En el grupo a, tenemos un subgrupo con la combinación de 75% de *N. oculata* en pasta con 25% de *P. pinguis* en pasta (NAP75PAP25), *P. pinguis* en pasta (PAP) y *N. oculata* en pasta

(NAP), sus promedios van desde 96 a 131 rot ml<sup>-1</sup>; en el segundo subgrupo de este experimento se encuentra: RC y NAP-RC, con promedios de 37.01 y 39.44 rot ml<sup>-1</sup> respectivamente. En el experimento 2 los subgrupos se conforman por NAV en el primero, donde su promedio sobrepasa los 200 rot ml<sup>-1</sup>; en el segundo se encuentran NAP85PAP15 (combinación de *N. oculata* al 85% y *P. pinguis* al 15%), MF, NAP-MF y RC 2 (Figura 8 b).

#### 4.1.2 Hembras por mililitro

Al analizar la parte de hembras por mililitro (hem ml<sup>-1</sup>), para cada tratamiento, observamos que la dieta que produjo un mayor número de hembras por mililitro fue la dieta NAP75PAP25 (Tabla 3, grupo a).

La Figura 9 muestra dos subgrupos de dietas para ambos experimentos, los cuales, son idénticos que en relación a rotíferos por ml.

Con relación a hembras por mililitro, no hubo un valor marcadamente elevado para los rotíferos alimentados con NAV (Figura 9 b), de hecho, gráficamente no fue el promedio mayor de hem ml<sup>-1</sup> (Tabla 3).

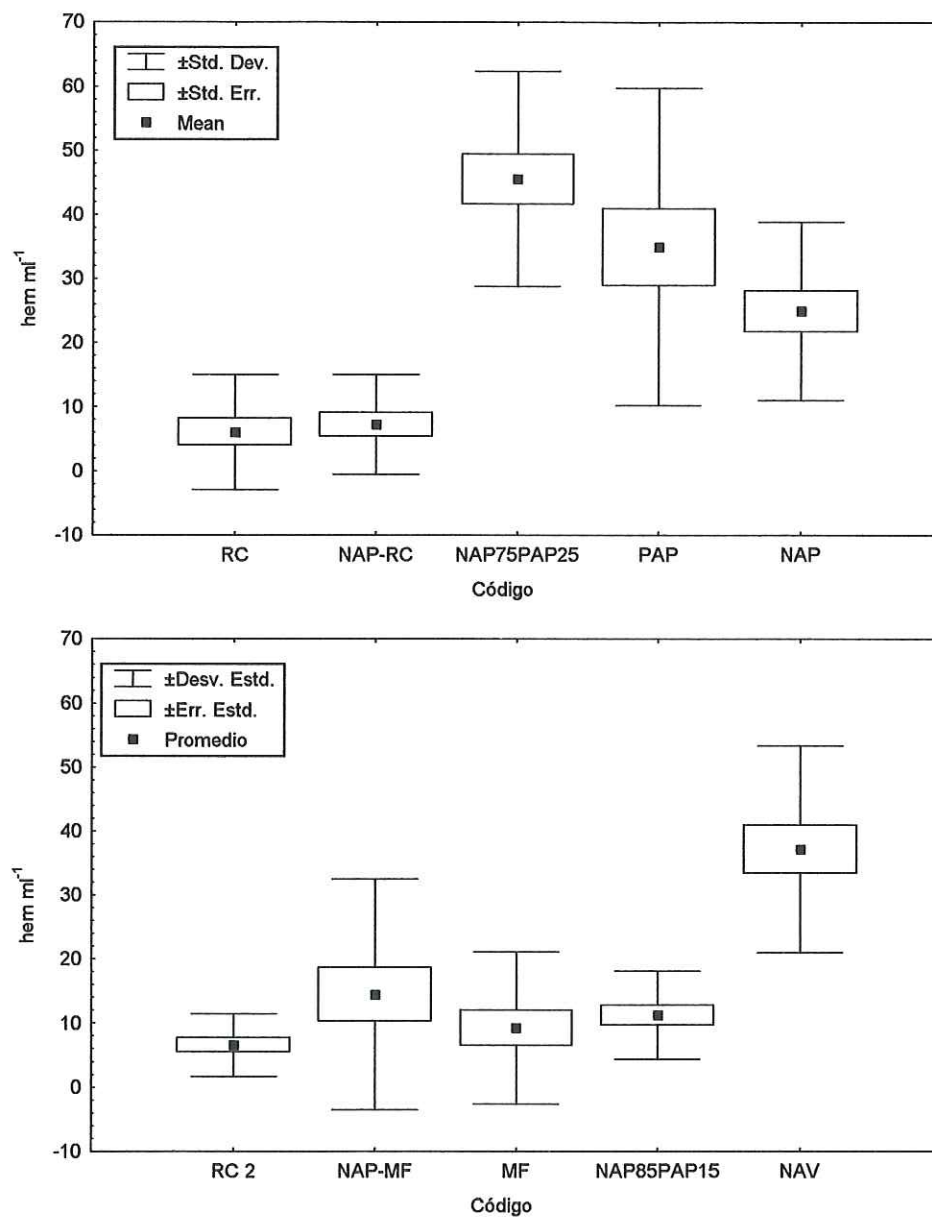


Figura 9. Promedios de hembras por mililitro en los días de cosecha durante el periodo de cultivo en los experimentos a) uno y b) dos.

Tabla 3. Promedios, medianas y ranqueo de Kruskal-Wallis [ $H(9, N=180) = 47.99737$   $p \leq .05$ ] de hembras por mililitro de cada dieta durante los 24 días de cultivo.

GRUPO A	PROMEDIOS	MEDIANAS	SUMA DE RANGOS
RC	6.07	2.66	813.0
NAP-RC	7.18	5.16	1063.5
NAP	24.95	26.33	2090.0
PAP	33.28	30.49	2190.0
NAP75PAP25	45.57	38.83	2724.5

GRUPO B	PROMEDIOS	MEDIANAS	SUMA DE RANGOS
RC2	6.55	4.83	1065.5
MF	9.25	3.83	1057.0
NAP85PAP15	11.23	11.16	1470.5
NAP-MF	14.45	3.83	1282.5
NAV	37.21	39.66	2533.5

#### 4.1.3 Fecundidad

Al hacer la comparación entre dietas utilizando como variable la fecundidad (huevos rotífero<sup>-1</sup>), al igual que en hembras por mililitro, la dieta que obtuvo los valores más altos fue NAP75PAP25 con un promedio de 0.401 huevos rotífero<sup>-1</sup> (Figura 10).

En referencia a la fecundidad, es complicado hacer distinción de subgrupos, sin embargo, la suma de rangos, nos facilita la clasificación de 2 subgrupos para el experimento 1, la cual, es similar a las clasificaciones de rot ml<sup>-1</sup> y hem ml<sup>-1</sup>. Para el experimento 2, prácticamente las 5 dietas se encuentran en el mismo subgrupo.

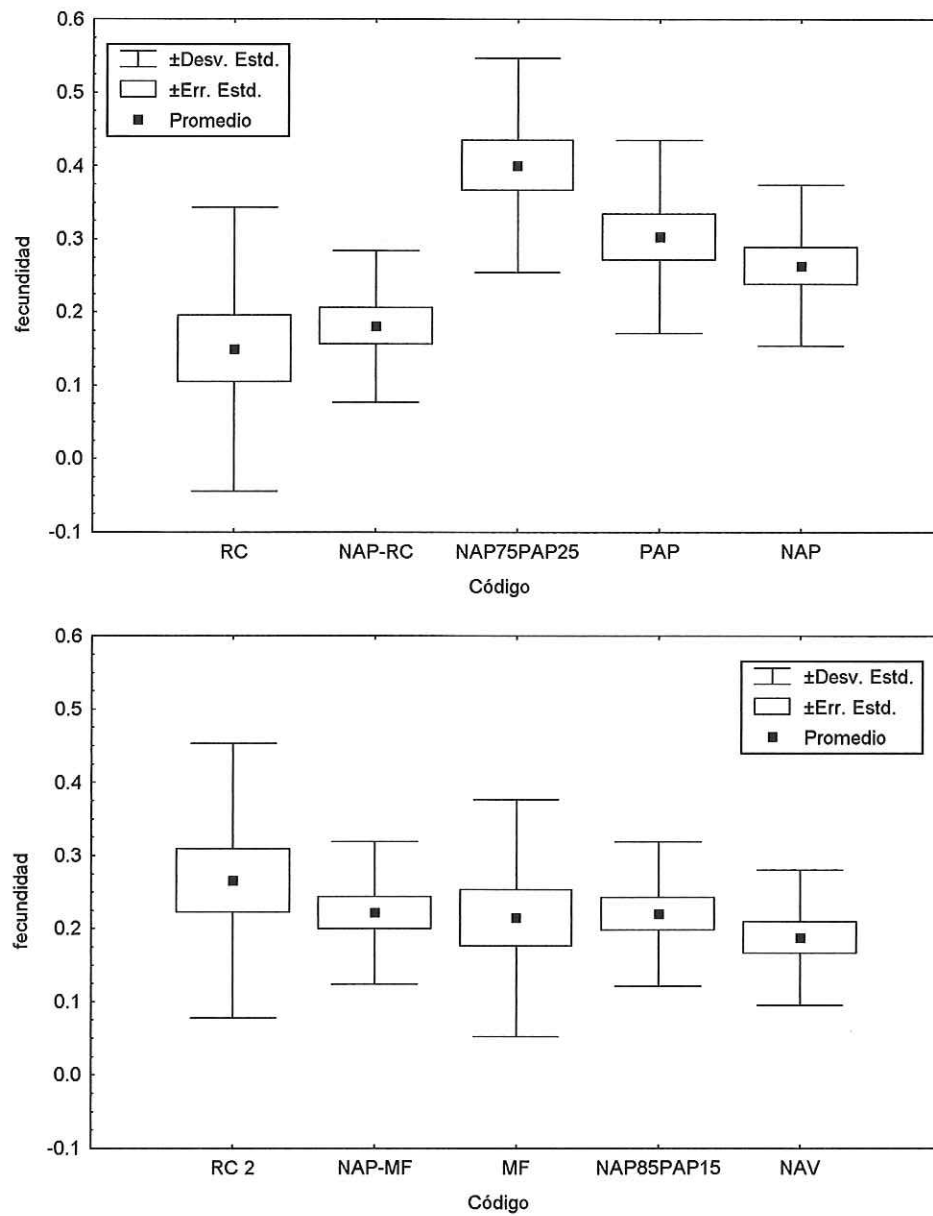


Figura 10. Promedios de la variable Fecundidad en los días de cosecha durante el periodo de cultivo en los experimentos a) uno y b) dos.

Tabla 4. Promedios, medianas y ranqueo de Kruskal-Wallis ( $H(9, N=180) = 47.99737$   $p \leq 0.05$ ) de la fecundidad de cada dieta, durante los 24 días de cultivo.

GRUPO A	PROMEDIOS	MEDIANAS	SUMA DE RANGOS
RC	0.149	0.106188	778.0
NAP-RC	0.177	0.160185	1229.0
NAP	0.263	0.264888	1881.0
PAP	0.299	0.320819	2075.5
NAP75PAP25	0.401	0.369438	2602.0

GRUPO B	PROMEDIOS	MEDIANAS	SUMA DE RANGOS
NAV	0.188	0.183157	1301.0
MF	0.202	0.143426	1374.0
NAP85PAP15	0.220	0.221846	1565.0
NAP-MF	0.221	0.203295	1585.0
RC2	0.288	0.275051	1899.5

Los resultados obtenidos en relación a huevos rotífero<sup>-1</sup> tienen un comportamiento fuera de lo proyectado. Mientras que los valores obtenidos con NAV no son de los mayores, la fecundidad para los organismos alimentados con dietas balanceadas es aparentemente alta (Figura 10).

#### 4.1.4 Factores fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos analizados en este experimento fueron: salinidad, temperatura y pH.

La salinidad fue un factor siempre constante (22 ppm). Para mantener el valor de salinidad, el medio se preparó diluyendo agua de mar con agua dulce antes de agregarla a los cultivos.

La variación de la temperatura no afectó la dinámica poblacional de los organismos (Tabla 5), al menos no se encontró ninguna tendencia de la dinámica poblacional influenciada por la temperatura.

Tabla 5. Promedio de la temperatura de los cultivos en cada dieta.

Dieta	Promedio
RC	24.5
RC 2	24.9
NAP-MF	25.1
NAP-RC	25.0
MF	25.2
NAP85PAP15	25.2
NAP75PAP25	24.9
PAP	26.3
NAP	24.4
NAV	24.8

El pH permaneció casi constante para todas las dietas, excepto para *Pavlova pinguis* en pasta (PAP). En la tabla 6 podemos observar como los valores de pH para PAP son más bajos que para el resto de las dietas.

Tabla 6. Promedio de pH en los cultivos para cada dieta.

Dieta	Promedio
RC	8.0
RC 2	7.8
NAP-MF	7.7
NAP-RC	7.7
MF	8.2
NAP85PAP15	7.8
NAP75PAP25	7.5
PAP	7.3
NAP	7.8
NAV	8.3

## 4.2 Seguimiento y descripción de la población en cultivos masivos.

Durante los once días de cultivo masivo, se le dió seguimiento a la dinámica poblacional y a los parámetros fisicoquímicos del agua. Se cuantificó: rotíferos por ml ( $\text{rot ml}^{-1}$ ), hembras por ml ( $\text{hem ml}^{-1}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), amonio ( $\text{NH}_4$ ), oxígeno ( $\text{O}_2$ ) y pH.

### 4.2.1 Densidad poblacional y producción diaria.

En la Figura 11, se observa el comportamiento diario de  $\text{rot ml}^{-1}$  en las cuatro réplicas durante el periodo de cultivo. El promedio de las cuatro réplicas en cada día de cultivo es superior a  $400 \text{ rot ml}^{-1}$ , por ello, es posible la extracción de organismos para utilizarlos como alimento. Dicha extracción es la producción diaria de rotíferos, los cuales son cosechados y utilizados como alimento. El promedio de los 11 días de cultivo fue de  $492.29 \text{ rot ml}^{-1}$ , siendo el día 11 el que alcanzó la mayor densidad de rotíferos con  $561.25 \text{ rot ml}^{-1}$  y el día con menor densidad fue el día 10 con  $442 \text{ rot ml}^{-1}$ .

Se logró producir, en promedio, un excedente a 640 millones de rotíferos diariamente durante un periodo de 11 días, sin embargo, las cuatro columnas no completaron los 160 millones de rotíferos todos los días, por

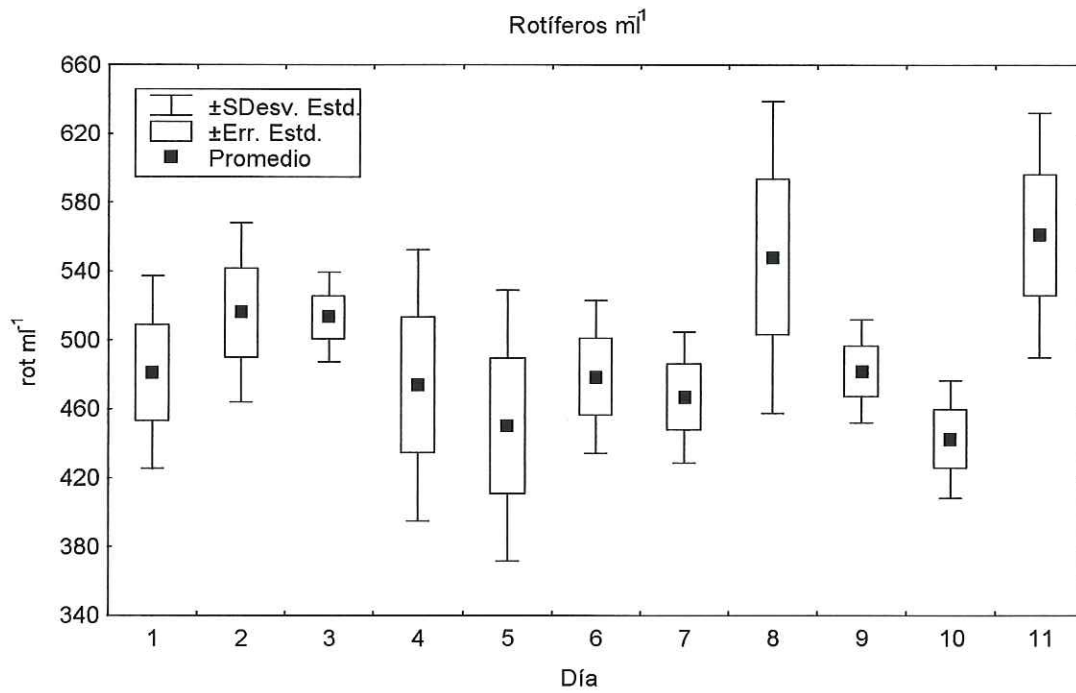


Figura 11. Promedio diario de rot ml<sup>-1</sup> en las cuatro columnas durante los 11 días de cultivo.

esto, las producciones fluctuaron de 68.2 a 258 millones de rotíferos cosechados sobre la población de 640 millones, teniendo así un promedio diario de 147.6 millones de rotíferos producidos y colectados en los 11 días (Figura 12).

Con relación a hembras por ml, se tuvo un promedio general de las cuatro réplicas durante todo el periodo de cultivo de  $141.5 \text{ hem ml}^{-1}$ . Haciendo un seguimiento diario de la población de hembras, se puede apreciar un comportamiento de oscilaciones de acuerdo con los días del ciclo de cultivo, donde los primeros 2 días de un ciclo de cultivo se mantienen con valores por encima de los siguientes dos días del mismo ciclo de cultivo (días 1,2 sobre los días 3 y 4, 5 y 6 sobre 7 y 8 y por último días 9 y 10 sobre el día 11) (Figura 13).

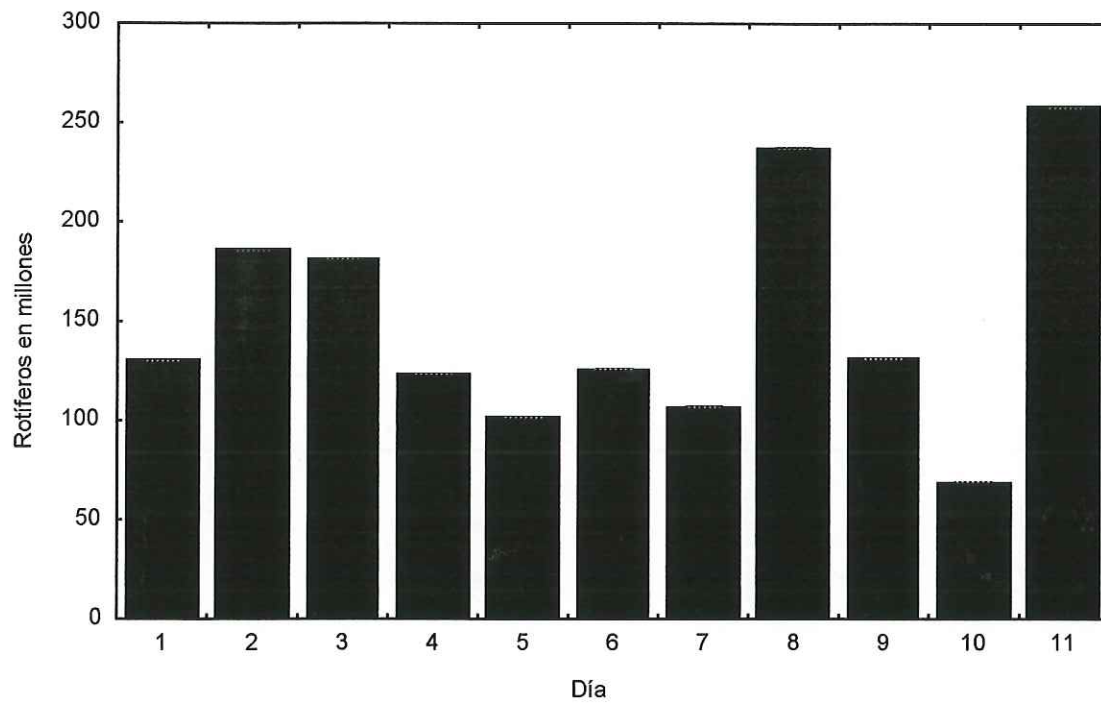


Figura 12. Sumatoria de la cosecha (producción) diaria de rotíferos de las cuatro columnas durante los 11 días de cultivo.

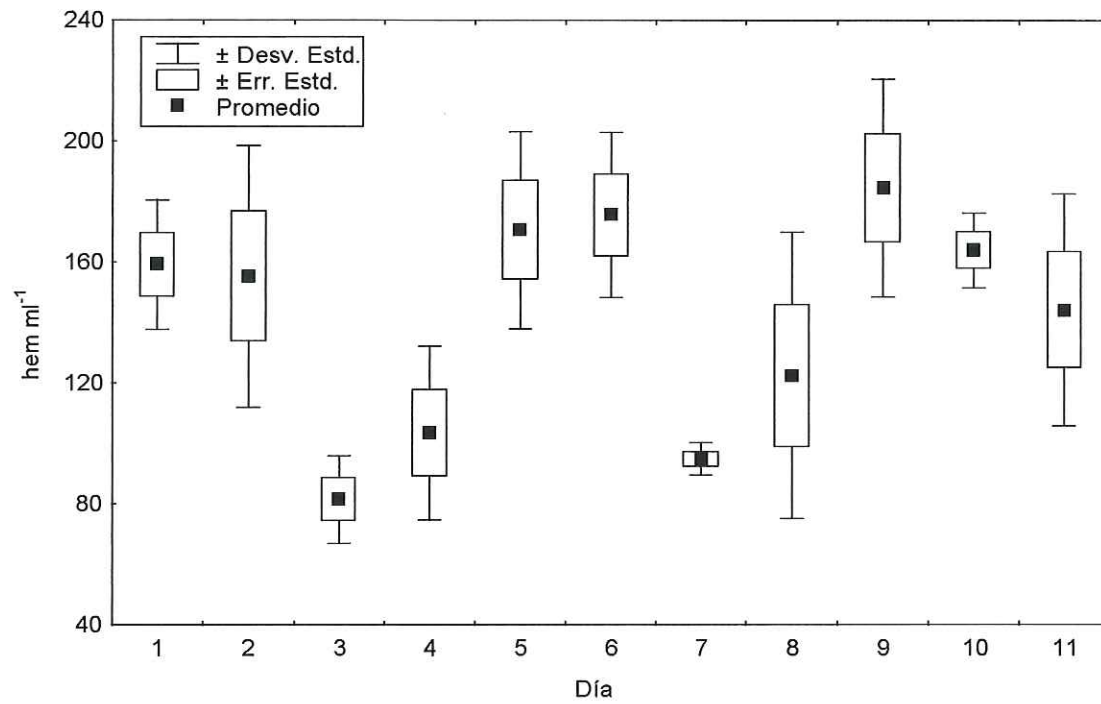


Figura 13. Promedio diario de hembras por mililitro en las cuatro columnas durante los 11 días de cultivo

#### 4.2.2 Parámetros fisicoquímicos del medio de cultivo.

Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron constantes, esto indica que a pesar de las variaciones relativas de dichos parámetros, éstos no mostraron ninguna influencia sobre la dinámica poblacional de los rotíferos (Tabla 7)(Figura 14 a, b, c y d).

Tabla 7. Comportamiento de los parámetros fisicoquímicos durante el periodo de cultivo.

Parámetro	Promedio	Mínimo	Máximo
T°C	27.81	27.60	28.00
AMONIO	1.34	0.92	1.88
O <sub>2</sub>	3.95	3.42	4.72
PH	7.74	7.55	7.95

La temperatura del medio de cultivo osciló entre 27.6 y 28 °C con un promedio de 27.81°C (Figura 14 a) (Tabla 7).

El amonio, tampoco mostró valores que afectaran la dinámica poblacional, su variación fue de 0.92 a 1.88 mg l<sup>-1</sup>, teniendo como promedio 1.34 mg l<sup>-1</sup> (Figura 14 b)(Tabla 7).

El oxígeno es un factor que también se mantuvo dentro de los parámetros tolerables para los rotíferos, ya que sus variaciones no afectaron

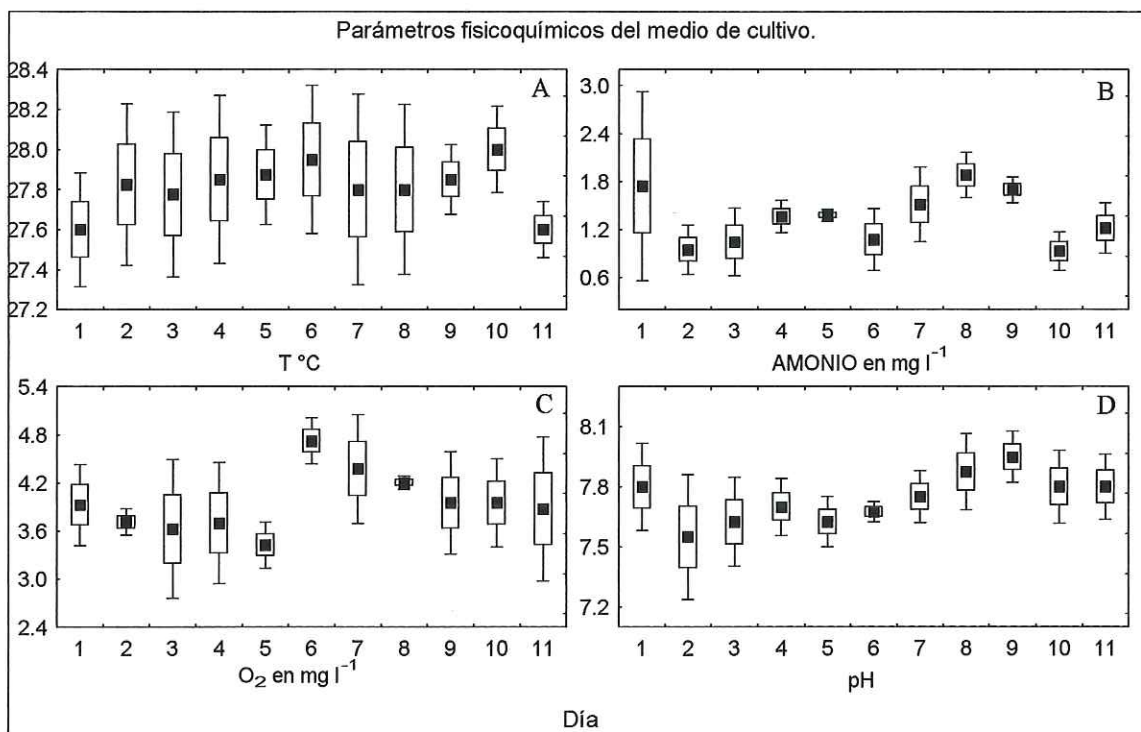


Figura 14. A). Variación y comportamiento de la temperatura ( $T^{\circ}\text{C}$ ), B) del amonio ( $\text{NH}_4$ ), C) del oxígeno ( $\text{O}_2$ ) y del D) pH. Durante los 11 días de cultivo.

a la dinámica poblacional (Figura 14 c). Con un promedio de 3.95 y una variación de 3.42 a 3.72 mg l<sup>-1</sup> (Tabla 7).

El pH de 7.55 a 7.95 (Tabla 7), fue uno de los parámetros más estables, tuvo como promedio 7.74 y sus variaciones no mostraron ser limitantes para los rotíferos (Figura 14 d).

## 5 DISCUSIONES

### 5.1 Experimentos 1 y 2: cultivos con diferentes dietas.

#### 5.1.1 Densidad poblacional.

##### 5.1.1.1 Rotíferos por ml.

En los 2 experimentos se compararon una serie de dietas con énfasis en evaluar los rotíferos por mililitro ( $\text{rot ml}^{-1}$ ). Apoyándonos en la prueba de Kruskal Wallis podemos decir que se tienen 2 subgrupos en cada experimento, según el tipo de alimento suministrado (Figura 8).

Siendo NAV nuestra control para el experimento 2, fue la dieta que produjo una mayor densidad de rotíferos ( $208.45 \text{ rot ml}^{-1}$ ), (Figura 8 a y b). Este resultado se puede deber a las ventajas que proporciona el alimento vivo. Las microalgas vivas cuentan con flotabilidad neutra y movilidad propia, lo que las hace disponibles en toda la columna de agua del medio de cultivo (Yoshimatsu *et al.*, 1997), además, por la misma movilidad que presentan, pueden ser reconocidas con facilidad por el zooplancton (Navarro, 1999).

Es posible que los altos resultados obtenidos con NAV, son debido a que los rotíferos hayan tenido menor limitación de alimento, ya que se ha comprobado que los desechos orgánicos del rotífero producen un medio

propicio para el cultivo de *Nannochloropsis sp.* (Chebil y Yamasaki, 1998). Otra ventaja que tiene la microalga viva es la capacidad de producir O<sub>2</sub> y reducir las concentraciones de amonio, factores fisicoquímicos limitantes para un buen cultivo de rotíferos.

Se tiene en el primer subgrupo del experimento 1 a las microalgas en pasta. Dentro de este grupo la dieta con mayor densidad poblacional es NAP75PAP25 con un promedio de 131.9 rot ml<sup>-1</sup> seguida por PAP y NAP con 112.9 y 96.44 rot ml<sup>-1</sup> respectivamente. En todos los cultivos de microalgas en pasta se registraron muestras de alimento sedimentado, esto nos podría dar una idea de que hubo desperdicio de alimento. Es probable que esto provoque menor densidad de organismos debido a un posible desperdicio de alimento y al deterioro de las condiciones del medio de cultivo por la proliferación de protozoarios y cambios en los valores de pH del medio de cultivo en específico por la oxidación de materia orgánica e incrementos en la acumulación de amonio (Hagiwara *et al.*, 1997; Lubzens *et al.*, 1997).

Tanto para el primer experimento como para el segundo tenemos un segundo subgrupo en común: se encuentran las dietas balanceadas. Siendo las que produjeron los valores de densidad poblacional más bajos (RC 37.01 rot ml<sup>-1</sup>, MF 34.47 rot ml<sup>-1</sup> y RC2 25.75 rot ml<sup>-1</sup>), aún las que se mezclaron con microalgas en pasta (NAP-MF 53.82 rot ml<sup>-1</sup> y NAP-RC 39.44 rot ml<sup>-1</sup>). Las dietas balanceadas consisten en partículas de nutrientes en contacto

directo con el medio de cultivo (Hino, 1993). Estas partículas, pueden ser más grandes que lo permitido por el mastax del rotífero, por lo que es imposible que sean ingeridos por los organismos, y por su tamaño se sedimentan en el fondo (Maeda e Hino, 1991).

La sedimentación del alimento en las dietas balanceadas fue visiblemente mayor que en las dietas a base de microalgas en pasta. También es importante mencionar que fueron las dietas con la mayor cantidad de protozoarios en los medios de cultivo, en especial MF. Lo que es posible que este tipo de alimento acelere la problemática que se menciona con las microalgas en pasta. Otro factor importante que hay que considerar dentro de las dietas balanceadas, es la posibilidad de deslave de nutrientes de los alimentos, ya que esto ocasiona la pérdida de nutrientes antes de ser ingeridos (Yúfera *et al.*, 1999).

En relación a las dietas balanceadas se observó que la dieta con mayor cantidad de alimento produjo la menor cantidad de rotíferos por ml (RC2). Probablemente al incrementar la dosis de alimento para consumo del rotífero, se incrementó el alimento sedimentado y por lo tanto se incrementó el deterioro del cultivo.

### 5.1.1.2 Hembras por ml y fecundidad.

Basándose en la prueba de Kruskal Wallis, se tienen básicamente 2 subgrupos de dietas en hem ml<sup>-1</sup> (Figura 9) para ambos experimentos. En el primer experimento, se encuentran las dietas de microalgas en pasta dentro del primer subgrupo y en el segundo se tienen las dietas que de algún modo están constituidas por alimento artificial. Esto podría confirmar el hecho que el alimento artificial degrada más el medio de cultivo que las pastas o el alimento vivo, ya que para el segundo experimento también se encuentran en un subgrupo ligeramente debajo del control. Sin embargo, tenemos a NAP85PAP15 dentro del segundo subgrupo del experimento 2, una dieta 100% compuesta por microalgas en pasta (Figura 9 b), no se encontró una posible explicación que fundamente los resultados con esta dieta, sin embargo, es posible que haya influido la capacidad selectiva de filtración del rotífero.

Tenemos a NAP75PAP25 (0.40 huevos rot<sup>-1</sup>) con el índice de fecundidad más alto. La mayoría de las dietas a base de alimento artificial, principalmente RC2 (0.28 huevos rot<sup>-1</sup>), presentan valores elevados de fecundidad, mientras que NAV (0.18 huevos rot<sup>-1</sup>) tiene una fecundidad relativamente baja. Debido a que la fecundidad es la razón del número de huevos entre la cantidad de rotíferos totales y como en algunas dietas se tienen poblaciones con muchos rotíferos y pocas hembras o pocos huevos

por hembra, este tipo de valores son generados por un arreglo matemático. Un claro ejemplo es NAV, hay que recordar que NAV es la dieta que alcanzó el mayor número de rot  $\text{ml}^{-1}$  y no fue la dieta que produjo más hem  $\text{ml}^{-1}$ , por lo que es una de las dietas con valores bajos en lo que a fecundidad se refiere. Por otro lado tenemos a RC (0.14 huevos  $\text{rot}^{-1}$ ) y a NAP-RC (0.17 huevos  $\text{rot}^{-1}$ ) como las dietas con menor índice de fecundidad y con menor densidad de población.

### 5.1.2 Factores fisicoquímicos.

Dentro de los parámetros analizados nos enfocaremos al pH, ya que los otros no mostraron alguna influencia claramente visible sobre la dinámica poblacional. De hecho el pH se encuentra estable para casi todas las dietas excepto para PAP. Tenemos que en el día 12 la densidad poblacional bajó considerablemente (Figura 7, PAP), en ese mismo día, se registró el valor de pH más bajo en todo el periodo experimental (pH 5.56). Ante este efecto, se podría decir que se tiene la evidencia que valores bajos de pH (debajo de 7.0) señalan un deterioro en el medio de cultivo para rotíferos y posibles pérdidas en la población; aunque no se pueda dar una explicación sustentable de la relación de bajos valores de pH (Tabla 6) con la mortalidad de rotíferos (Figura 7, PAP).

## 5.2 Autoescalación del cultivo de rotíferos en volúmenes de 400 litros.

### 5.2.1 Densidad poblacional.

El promedio de rotíferos por ml fue de 492.29 rot ml<sup>-1</sup>, mientras que el de las hembras fue de 141.52 hem ml<sup>-1</sup> y la fecundidad promedio durante los 11 días de cultivo fue de 0.289 huevos rot<sup>-1</sup>. El día 11 fue donde la densidad poblacional alcanzó su mayor valor con 569.68 rot ml<sup>-1</sup>, el día 9 fue el máximo valor para hembras por mililitro (184.68 hem ml<sup>-1</sup>) y fecundidad (0.378).

Aunque el periodo experimental duró 2 ciclos completos de 4 días y uno de 3 (11 días), se logró observar un patrón tanto en la densidad de hembras como en la fecundidad, donde los primeros 2 días del ciclo presentan valores superiores a los últimos días. Esto puede deberse a que las condiciones del agua son mejores en los primeros dos días de cultivo comparado con los últimos dos días debido a que el cultivo tiene agua nueva. Es posible, también, que el tipo de reproducción del rotífero se dé en ciclos de dos días; sin embargo, esta es una situación que no se ha encontrado reportada. Otra posibilidad sería, que se estresara a la población por la manipulación de los organismos y cambios bruscos del medio de cultivo (Pourriot, 1990).

Se reforzó el conocimiento de que es importante la estabilidad de los parámetros fisicoquímicos del medio manejados en este trabajo. Por esa razón se decidió mantener la salinidad de los cultivos a la salinidad del agua de mar (33 ppm). Por otro lado se trató de mantener el pH al valor en el cual llega el agua de mar (7.9). Esto se logró implementando un sistema de control de pH mediante goteos de NaOH.

Se requieren aproximadamente 640 millones de rotíferos para extraer 160 millones de rotíferos por día, en casi todos los días de experimentación se logró obtener dicha cantidad de organismos, de hecho, el día 11 se produjeron más rotíferos de los necesarios, por otro lado en el día 3 apenas se contaban con la cantidad base (640 millones de organismos) de organismos (día 3 y 10). Después de haber logrado cultivar rotíferos sin la necesidad de alimento vivo por 24 días en los experimentos 1 y 2, en la prueba piloto no solo se logró mantener un cultivo de forma masiva durante 11 días, sino que inclusive se logró hacerle cosechas diarias a las columnas de cultivo. Las cosechas representarían el consumo diario que se pudiera generar si se quisiera alimentar larvas en la UBP a toda su capacidad de carga. Ya que el éxito en la crianza de cualquier larva marina, depende de la continua disponibilidad de microorganismos como alimento vivo (Tawfiq *et al.*, 1997).

Se implementó un sistema de recirculación (SR), con el cual se evitaron los problemas de gradientes de pH, anoxicidad y amonio, en las columnas de cultivo. Ya que el SR recirculó el agua del cultivo y extrajo las partículas suspendidas en el agua de los cultivos.

### 5.2.2 Alimentación

Debido a la fácil sedimentación del alimento, fue necesario la implementación de una alternativa en el suministro del alimento. Se utilizó un sistema de alimentación por goteo, el cuál dosificaba el alimento (Figura 6 a y b). Se observó que la calidad del alimento depende mucho para que el rotífero quiera ingerirlo o no, debido a que su alimentación es por medio de filtración selectiva (Barnes, 1990), el alimento que no es ingerido por los rotíferos puede dañar el medio de cultivo (Navarro, 1999). También, se suministró el alimento dependiendo de la densidad de rotíferos (alimento  $\text{rot}^{-1}$ ) a diferencia del experimento 1, donde el suministro de alimento se basó en el volumen de cultivo (alimento  $\text{ml}^{-1}$ ). Este sistema de suministro permitió el uso más eficiente del alimento, al evitar la sedimentación del mismo. Esto es fácil de demostrar al hacer una comparación en el suministro de alimento respecto al experimento 1. Por un lado tenemos  $25 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$  de alimento suministrado en el experimento 1, el cual, es consumido por  $96.44 \text{ rot ml}^{-1}$  promedio, lo que equivale a  $0.259 \times 10^6 \text{ cel rot}^{-1}$ . Mientras

que en el experimento 2 se alimentaron  $492.29 \text{ rot ml}^{-1}$  en promedio con  $0.098 \times 10^6 \text{ cel rot}^{-1}$  lo que nos da como resultado  $48.24 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ . En relación a células de alimento por ml y a rotíferos por ml, el incremento en alimento es el doble en el experimento 2, sin embargo, la densidad de rotíferos se quintuplica prácticamente. Lo que nos dice que además de permitir el cultivo a mayor densidad, el sistema eficientiza el consumo de alimento (Tabla 8).

Tabla 8. comparación del suministro de alimento entre los 2 experimentos

	Rot $\text{ml}^{-1}$	Alimento $\text{rot}^{-1}$
Experimento 1	96.44	$0.259 \times 10^6$
Experimento 2	492.29	$0.098 \times 10^6$

Debido a las características que presentan las microalgas en pasta, en este experimento se utilizó *Nannochloropsis oculata* en pasta (NAP). El uso de microalgas en pasta tiene la facilidad de manipulación de un alimento comercial y se puede disponer del alimento durante todo el periodo de cultivo (Lubzens *et al.*, 1995; Navarro, 1999). Dentro de la disponibilidad de fuentes comerciales de microalgas en pasta, se seleccionó NAP por el hecho de que no produjo protozoarios, además de ser la alternativa más económica respecto a las otras dietas en pasta, debido a la concentración en la que viene la pasta (68 mil millones de células por ml). La única otra especie en pasta con tamaño apropiado es *Pavlova pinguis* pero su

presentación de 8 mil millones de células por ml, produce que incremente su valor económico, lo cual, las dietas PAP y NAP75PAP25 resultan muy costosas. Además la especie *Nannochloropsis sp.* ya sea viva o inerte se encuentra dentro de las selecciones consideradas por varios autores (Hirayama *et al.*, 1979; Navarro y Yufera, 1998; Navarro, 1999; Rueda, 1996), es posible que esto se deba por la fácil manipulación de la microalga. Sin embargo, el considerar una dieta de microalgas vivas como NAV, representa el acondicionamiento de otro laboratorio exclusivo para la producción de microalgas. Ya que para lograr el objetivo de cultivar rotíferos de forma masiva, sería necesario cultivar 3 estanques de 8 m<sup>3</sup> para producir las microalgas requeridas, según los resultados del experimento 1, ya que las concentraciones de microalgas proporcionadas por el IIO llegaron a densidades de hasta 28.35 x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup> siendo 22.15 x10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup> el promedio durante todo el ciclo de cultivo del experimento 1. Por otro lado tenemos que los valores obtenidos con los alimentos artificiales descartan por si solos la posibilidad de utilizar esas alternativas para este experimento.

### 5.2.3 Parámetros fisicoquímicos y sistemas de cultivo.

Si bien es atractivo tener cultivos masivos de rotíferos, resulta un poco complicado conseguirlo, de hecho, existen pocos trabajos que reporten sus valores obtenidos en la producción de rotíferos en forma masiva, aún

siendo el rotífero un alimento muy importante en el cultivo de larvas de peces. Tratando de conocer los límites de capacidad de carga, se midió: **T°C** (osciló entre 27.6 y 28 °C con un promedio de 27.81°C), **amonio** (su variación fue de .92 a 1.88 mg l<sup>-1</sup>, teniendo como promedio 1.34 mg l<sup>-1</sup>), **O<sub>2</sub>** (promedio de 3.95 y una variación de 3.42 a 4.72 mg l<sup>-1</sup>,) y **pH** (de 7.55 a 7.95, tiene como promedio 7.74). Que al ser comparados con el trabajo de Suantika *et al.* (2000), tenemos que nuestros parámetros de amonio, O<sub>2</sub> y pH se mantuvieron más estables (la temperatura no le dio importancia en el trabajo bibliográfico). Suantika *et al.* (2000), presenta valores de amonio de más de 18 mg l<sup>-1</sup>, con respecto al O<sub>2</sub>, su valor mínimo fue de 4.5 y su máximo de 8 mg l<sup>-1</sup>; por otro lado tenemos el pH, donde la variación fue de 7.4 a 8.3.

Es posible que la estabilidad en los valores de nuestros parámetros fisicoquímicos, se lograron con los implementos que nos facilitaron a cultivar rotíferos de manera masiva, como lo son: el uso de un sistema de recirculación "SR" (Figura 4), recambios parciales del 50% del agua diario y aireación adecuada proveída por el *airlift* y la línea de aireación principal. Con estos implementos una de las réplicas alcanzó más de 738.35 rot ml<sup>-1</sup> en el día 8 del periodo de experimentación.

El desarrollo de técnicas innovadoras en el cultivo de rotíferos, como lo es: inyección de O<sub>2</sub> líquido, control de pH las 24 h, control de amonio,

sistema semicerrado con filtros biológicos y recambios del 500% de agua diaria, entre otros; han abierto una ventana para el uso de alimentos artificiales, logrando densidades superiores a los 2000 rot ml<sup>-1</sup> (Suantica *et al.*, 2000). El problema con estas innovaciones es que resultan muy costosas, y probablemente el ahorro que brinda el uso de estas dietas resulta poco redituable, sin embargo, en el presente trabajo se demuestra la posibilidad en este trabajo que es posible disminuir costos y omitir el uso de equipo sofisticado.

## 6 CONCLUSIONES

- El tipo de alimento que produjo una mayor cantidad de rotíferos es el alimento vivo, sin embargo, se puede prescindir de la microalga viva para mantener un cultivo de rotíferos.
- Los alimentos nombrados como dietas balanceadas, propician un deterioro en el medio de cultivo mayor que las microalgas vivas y en pasta en cultivos discontinuos de 2 a 8 litros.
- Las pastas son una buena opción para el cultivo de rotíferos.
- La alimentación por goteo, un sistema de recirculación del medio y un control continuo del pH, puede mantener, eficientemente, un cultivo de rotíferos por 11 días a una densidad promedio de 492.29 rotíferos por mililitro y extrayendo, en promedio, 147.6 millones de rotíferos diariamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Rezq, T., Al-Shimmari, J. and Dias, P., 1997. Live food production using batch culture and chemostat systems in Kuwait. *Hidrobiología*. 358; 173-178.
- Barnes, Robert A. 1990. *Zoología de los Invertebrados*. Interamericana, 5ta Ed., México D.F; 942.
- Chebil, L., Yamasaki, S. 1998. Improvement of a rotifer ecosystem culture to promote recycling marine microalga, Improvement of a rotifer ecosystem culture to promote recycling marine microalga, *Nannochloropsis sp.* *Acuacultural engineering*. 17; 1-10.
- Hino, A., 1993. Present culture system of the rotifer *Brachionus plicatilis* and the function of micro-organisms. In: Proc. Finfish Hatchery in Asia '91, Tungkang Marine Lab. Taiwan Fisheries Research Inst., TML Conf. 3, 51-59.
- Hagiwara, A., Balompapueng, M.D., Munuswamy, N. and Hirayama, K., 1997. Mass production and preservation of the resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. *Aquaculture*. 155; 223-230.
- Kinne, O., 1977. *Marine ecology*. vol. 3 pt. 2. John Wiley and Sons., New York; 579-1287.

- Kogane, T., Hagiwara, A. and Imaizumi, K., 1997. Temperature conditions enhancing resting egg production of euryaline rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller (Kamiura strain). *Hidrobiología*. 358; 167-171.
- Korstad, J., Neyts, A., Danielsen, T., Overrein, I. and Olsen, Y. 1995. Use of swimming speed and egg ratio as predictors of the status of rotifer cultures in aquaculture. *Hydrobiologia*. 313; 395-398.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis sp.*) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*. 133; 295-309.
- Lubzens, E., Minkoff, G., Barr, Y., and Zamora, O., 1997. Mariculture in israel – past achievements and future directions in raising rotifers as food for marine fish larvae. *Hidrobiología*. 358; 13-20.
- Maeda, M., Hino, A., 1991. Environmental management for mass culture of the rotifer, *Brachionus plicatilis* and microalgae culture system. The oceanic institute. 125-133.
- Maruyama, I., Nakao, T., Shigeno, I., Ando, Y., Hirayama, K. 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia*. 358; 133-138.
- Morales, C. O., 1999. Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Licenciatura. FCM. UABC. Ensenada B.C. 56 pp.

- Navarro, N., 1999. Feeding behaviour of the rotifers *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* with two types of food: live and freeze-dried microalgae. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 237; 75-87.
- Navarro, N., Yúfera, M., 1998a. Influence of the food ration and individual density on production efficiency of semicontinuous cultures of *Brachionus*-fed microalgae dry powder. *Hydrobiologia*. 387/388; 483-487.
- Navarro, N., Yúfera, M., 1998b. Population dynamics of rotifers (*Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis*) in semicontinuous culture fed freeze-dried microalgae: influence of dilution rate. *Aquaculture*. 166; 297-309.
- Pousão, P., Cairrão, F., Nery, F. y Narciso, L. 1997. El perfil de los ácidos grasos de larvas de *Sparus aurata* se correlaciona con la composición de dietas de enriquecimiento de *Brachionus plicatilis* y *Artemia* sp. *Ciencias Marinas*. 32 (1); 83-92.
- Reitan, I. K., Rainuzzo R.J., Øie, G., Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*. 155;207-221.
- Robert, R. and Trintignac, P. 1997. Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquat. Living Resour* 10; 315-327.
- Rueda-Jasso, R.A. 1996. Efecto nutricional de tres microalgas y una cianobacteria en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* Müller: 1786.. *Ciencias Marinas*. 22 (3); 313-328.

- Snell, T.W. and K. Carrillo, 1984. Body size variation among strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*. 37; 359-367.
- Scott, J.M. 1980. Effect of growth rate of food alga on the growth/ingestion efficiency of a marine herbivore. *F. Mar. Biol. Ass. U.K.* 60; 681-702.
- Sommer, T.R., Potts, W.T. and Morrissy N.M., 1990 Recent progress in the use of processed microalgae in aquaculture. *Hydrobiologia*. 204/205; 435-443.
- Suantika, G., Dhert, M., Nurhudah, M., Sorgeloos, P., 2000. High-density production of the rotifer *Brachionus plicatilis* in a recirculation system: consideration water quality, zootechnical and nutritional aspects. *Aquacultural engineering*. 21 201-214.
- Tocher, D.R., Mourente, G. y Sargent, J.R., 1997. The use of silages prepared from fish neural tissues as enrichers for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. *Aquaculture*. 148; 213-231.
- Ville, Claude A. 1992. *Biología*. McGraw-Hill, 2da Ed., México D.F.; 1312.
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Kitajima, C. and Hagiwara, A., 1997. Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. *Hydrobiologia* 358; 139-144.

- Yúfera, M., Navarro, N., 1995. Population growth dynamics of the rotifer *Brachionus plicatilis* cultured in non-limiting food condition. *Hydrobiologia*. 313/314; 399-405.
- Yúfera, M., Pascual, E., Fernández, C., 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. *Aquaculture*. 177; 249-256.
- Øie, G., Makridis, P., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*. 153; 103-122.