



SECRETARIA  
DE  
EDUCACION PUBLICA

**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MARINA

**EFFECTO DEL ALIMENTO EN EL CULTIVO DEL ROTIFERO**  
*Brachionus plicatilis* (Müller: 1786)  
**EN UN SISTEMA SEMICONTINUO.**

**TESIS**

que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Marinas  
p r e s e n t a :

**Biol. Mar. Rebeca Aneli Rueda Jasso**

# I N D I C E

Agradecimientos.....	i
<b>Glosario.....</b>	<b>11</b>
Indice de Figuras.....	v
Indice de Cuadros.....	vi
<b>1.- Resumen.....</b>	<b>1</b>
1.1 <b>Abstract.....</b>	<b>1</b>
<b>2.- Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>3.- Antecedentes.....</b>	<b>4</b>
3.1 Breve historia del cultivo de rotíferos.....	5
3.2 Clasificación de los cultivos.....	6
3.2.1 Cultivos estacionarios o <b>contínuos</b> .....	6
3.2.2 Cultivos semicontínuos.....	7
3.2.3 Cultivos retroalimentados.....	8
3.3 Tipos de alimento.....	8
3.3.1 Microalgas.....	8
3.3.2 Levaduras.....	10
3.3.3 Alimentos <b>inertes</b> .....	11
<b>4.- Justificación.....</b>	<b>13</b>
<b>5.- Objetivo general.....</b>	<b>6</b>
5.1 Objetivos particulares.....	6
<b>6.- Material y métodos.....</b>	<b>7</b>
6.1 Aislamiento de la cepa.....	7
6.2 Condiciones del cultivo de rotíferos.....	8
6.3 <b>Alimentos.....</b>	<b>18</b>
6.4 Determinaciones bioquímicas.....	2
6.4.1 Determinación de peso seco.....	2
6.4.2 Determinación de carbohidratos.....	2
6.4.3 Determinación de proteínas.....	2
6.4.4 Determinación de lípidos.....	2
6.5 Diseño experimental.....	3
6.5.1 Determinación de la ración óptima para cada tipo de alimento.....	3
6.5.2 Determinación bioquímica de las raciones óptimas.....	5
6.6 Análisis estadístico.....	5
6.6.1 Obtención de las raciones óptimas.....	5
6.6.2 Determinaciones bioquímicas.....	6
<b>7.- Resultados.....</b>	<b>8</b>
7.1 Determinación de la ración óptima para cada tipo de alimento.....	8
7.2 Determinaciones bioquímicas de las raciones óptimas.....	3
<b>8.- Discusión.....</b>	<b>7</b>
8.1 Determinación de la ración óptima para cada tipo de alimento.....	7
8.1.1 <b>Chlorella sp.</b> .....	3
8.1.2 <b>Nannochloris sp.</b> .....	4
8.1.3 <b>Nannochloropsis sp.</b> .....	4
8.1.4 <b>Spimlina sp.</b> .....	4
8.1.5 <b>Topal</b> .....	4

8.2	Determinaciones bioquímicas . . . . .	46
8.2.1	Peso seco.....	47
8.2.2	Carbohidratos totales.....	48
8.2.3	Proteínas <b>totales</b> .....	48
8.2.4	Lípidos totales.....	49
8.2.5	Valor energético.....	51
8.3	Confiabilidad de los resultados <b>obtenidos</b> .....	53
9.-	<b>Conclusiones</b> .....	55
10.-	<b>Recomendaciones</b> .....	56
11.-	<b>Bibliografía</b> .....	57

## G L O S A R I O

ABSORCION DEL SACO VITELINO: Etapa en el desarrollo de las larvas de peces, en el cuál consumen completamente el vitelo (sustancias de reserva) e inician la etapa de la alimentación exógena.

ALICUOTA: Muestra representativa del conjunto total, en este trabajo se refiere a una muestra de un mililitro tomada del vólumen de resuspensión.

ALIMENTACION ENDOGENA: Etapa durante el desarrollo de las larvas de peces, en la que sus requerimientos nutritivos son provistos por el vitelo.

ALIMENTACION EXOGENA: Etapa durante el desarrollo de las larvas de peces, en la que sus requerimientos nutritivos provienen de los alimentos filtrados ó capturados del medio. El inicio de esta etapa ocurre al concluir la absorción del saco vitelino.

ALIMENTO INERTE: Alimento no vivo, puede ser congelado, deshidratado, pulverizado, hojuelas ó un alimento formulado.

BIOENSAYO: Estimación cualitativa ó cuantitativa del efecto de un factor biótico ó abiótico, en un sistema biológico bajo condiciones controladas.

BIOFERMENTACION: Proceso de transformación de la materia orgánica, que se lleva a cabo con la intervención de microorganismos tales como levaduras y bacterias, obteniéndose como producto moléculas más sencillas, las cuales son nuevamente aprovechables.

CEPA: Conjunto de microorganismos aislados e identificados, que sirven de origen en la realización de cultivos.

COMPONENTES BIOQUIMICOS: Conjunto formado por los totales de las cenizas, carbohidratos, proteínas y lípidos, presentes en todo alimento. Su evaluación permite conocer su valor nutricional.

DETERMINACIONES BIOQUIMICAS: Conjunto de técnicas de laboratorio empleadas para la evaluación cualitativa y cuantitativa de los componentes bioquímicos.

FASE PREJUVENIL: Etapa que forma parte del periodo juvenil en el desarrollo de las larvas de peces, en la cual los organismos han alcanzado los elementos merísticos de los adultos, excepto en la pigmentación y la escarnación.

**FECUNDIDAD:** Valor que indica la capacidad de una población de generar descendientes por unidad de tiempo. En este trabajo se utiliza como una medida de salud de los individuos. Su fórmula está basada en la relación del número de huevos puestos en promedio por cada hembra rotífero.

**HEMATOCITOMETRO:** También conocido como cámara de New Vauer, es un portaobjetos, con un cubreobjetos de peso específico y con una retícula especial de volumen conocido, que sirve para contabilizar partículas microscópicas (microalgas), presentes en una muestra y posteriormente relacionarlo con la densidad del volumen total.

**INOCULO:** Conjunto de microorganismos que se agregan a un medio de cultivo para su crecimiento. Parte del volumen de resuspensión, que se utiliza para establecer un nuevo ciclo del cultivo de rotíferos.

**METAZOARIOS:** Organismos animales cuyos cuerpos están compuestos por células especializadas, agrupadas en forma de tejidos y con un sistema nervioso que los coordina.

**PERIODO LARVARIO:** etapa en el desarrollo inicial de los peces que se inicia con la absorción del saco vitelino y finaliza cuando se completa el número de elementos de las aletas pares e impares.

**PARAMETRO:** Según el American Heritage Dictionary of the English Language, parámetro es una variable ó constante arbitraria que aparece en una expresión matemática. Sin embargo, de acuerdo al Webster's Ninth New Collegiate Dictionary y al Random House Dictionary of English Language, parámetro puede usarse como un término colectivo para las características de algo ó para variables medibles (Tomado de Hunter, 1990). Para este estudio se considera como parámetros al número de rotíferos considerando huevos (rch) y a la fecundidad, observados en las diferentes unidades experimentales de los diferentes bioensayos.

**POBLACION:** Para este estudio se considera como el conjunto total de los rotíferos presentes en cada una de las unidades experimentales (garrafones con 1.5 l. de volumen), los cuáles partieron de una población común y se utilizaron en los diferentes bioensayos.

**PRODUCCION:** Parámetro utilizado en este trabajo, que indica el total de organismos (rotíferos considerando huevos) presentes en el medio de cultivo, en cierto periodo de tiempo.

**PSEUDOCELOMADOS:** Característica utilizada para clasificar a algunos invertebrados, que se refiere a que la cavidad del cuerpo no es un verdadero celoma, debido a la persistencia del blastocele.

**RENDIMIENTOS:** Evaluación de la cantidad de rotíferos generados en un cultivo.

RCH: Abreviatura que indica rotíferos considerando huevos. Es el número de rotíferos presentes por mililitro de cultivo, teniendo en consideración a los huevos, que en un corto período de tiempo eclosionaran y tendran requerimientos similares a los que tienen los adultos (alimento).

REPRODUCCION AMICTICA: Reproducción asexual en la cual las hembras de rotífero por medio de mitosis generan hijas idénticas. Este tipo de reproducción ocurre cuando las condiciones ambientales y alimenticias son adecuadas y constantes.

REPRODUCCION MICTICA: Reproducción sexual. Las hembras amícticas que sufren condiciones de estres generan machos (de corto tiempo de vida), los cuales participan en la reproducción meiótica, posteriormente se generan quistes ó huevos de resistencia que eclosionaran cuando las condiciones ambientales sean favorables.

ROTOVAPOR: Aparato de destilación en el cual se puede controlar la temperatura y la presión.

VALOR ENERGETICO: Se define como el contenido de energía de una sustancia, determinado por la completa oxidación del compuesto en dióxido de carbono, agua, gases y como producto principal calor.

VOLUMEN DE RESUSPENSION: Volúmen en el que los rotíferos cultivados son concentrados, eliminando el medio de cultivo y agregando agua filtrada. De este volúmen se toman las muestras necesarias, el inóculo y la fracción restante se utiliza como alimento para larvas de peces.

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.- Especies de microalgas que han sido utilizadas como alimento en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*.

Cuadro 2.- Alimentos alternativos que se han utilizado en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*.

Cuadro 3.- Trabajos internacionales en los que se describe la utilización del rotífero *Brachionus plicatilis* como primer alimento para larvas de peces.

Cuadro 4.- Trabajos realizados por el grupo del CICIMAR - IPN en los cuáles se utilizó al rotífero *Brachionus plicatilis* como primer alimento de las larvas de peces.

Cuadro 5.- Reactivos y concentraciones del medio de cultivo Marino 1.

Cuadro 6.- Alimentos y raciones utilizadas en la realización de los diferentes bioensayos.

Cuadro 7.- Pruebas estadísticas que se aplicaron a los datos obtenidos en los diferentes bioensayos

Cuadro 8.- Tabla ANDEVA, comparaciones entre pesos secos.

Cuadro 9.- Tabla ANDEVA, comparaciones entre los contenidos de carbohidratos totales.

Cuadro 10.- Tabla ANDEVA, comparaciones entre los contenidos de proteínas totales.

Cuadro 11.- Tabla ANDEVA, comparaciones entre los contenidos de lípidos totales.

## FIGURAS.-

Figura 1.- Tipos de alimento utilizados en los períodos larvario y en la fase prejuvenil de las larvas de peces.

Figura 2.- Diagrama de flujo de la técnica de mantenimiento de la cepa y del cultivo de rotíferos.

Figura 3.- Diagrama de flujo de las técnicas bioquímicas.

Figura 4.- Diagrama de flujo del diseño experimental.

Figura 5.- Producción (rotíferos considerando huevos por ml de cultivo) obtenidos en la experimentación con alimentos vivos.

Figura 6.- Producción (rch) obtenidos en la experimentación con alimentos inertes.

Figura 7.- Fecundidades obtenidas en la experimentación con alimentos vivos.

Figura 8.- Fecundidades obtenidas en la experimentación con alimentos inertes.

Figura 9.- Medias y desviación estándar de los pesos secos.

Figura 10.- Medias y desviación estándar de los contenidos totales de los carbohidratos.

Figura 11.- Medias y desviación estándar de los contenidos totales de las proteínas.

Figura 12.- Medias y desviación estándar de los contenidos totales de los lípidos.

Figura 13.- Porcentajes de los componentes bioquímicos en los tratamientos a. -) **Nannochloropsis sp.**, b.-) **Spirulina sp.** deshidratada, c.-) **Nannochloris sp.** y d.-) **Chlorella sp.**.

Figura 14.- Variación de los componentes bioquímicos en los rotíferos alimentados con **Nannochloropsis sp.**.

Figura 15.- Variación de los componentes bioquímicos en los rotíferos alimentados con **Nannochloris sp.**.

Figura 16.- Variación de los componentes bioquímicos en los rotíferos alimentados con **Chlorella sp.**.

Figura 17.- Variación de los componentes bioquímicos en los rotíferos alimentados con **Spirulina sp.** deshidratada.

## 1.- R E S U M E N

Efecto del alimento en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (Müller: 1786) en un sistema semicontinuo.

Aunque el rotífero *Brachionus plicatilis* no forma parte de la dieta natural de muchos peces marinos, se ha utilizado intensivamente, debido a las características que posee: su tolerancia a intervalos amplios de temperatura y salinidad, diferentes prácticas de cultivo masivo, su tamaño pequeño y su movilidad reducida, lo cuál permite a las larvas de peces ingerirlos cuando aún no son capaces de capturar otro tipo de presa.

En el presente trabajo se probaron cinco alimentos de dos tipos: vivos e inertes, en diferentes raciones cada uno, buscando la mejor ración, los parámetros observados fueron número de rotíferos considerando huevos (rch) y fecundidad (relación huevos/hembra). Posteriormente con las raciones óptimas se realizaron las determinaciones bioquímicas (carbohidratos, proteínas y lípidos totales) obteniendo la mejor dieta.

De los alimentos vivos probados se encontró que: *Nannochloris sp.* en una densidad de  $25 \times 10^6$  cel/ml produce los mayores rendimientos, seguido por *Nannochloropsis sp.* con  $25 \times 10^6$  cel /ml, *Chlorella sp.* con  $35 \times 10^6$  y finalmente *Spirulina sp.* deshidratada en una densidad de 0.9 g/1.5 l. El alimento Topal se evaluó como un alimento deficiente.

Con base en las determinaciones bioquímicas (carbohidratos, proteínas, lípidos totales y valor energético) el mejor alimento fué *Chlorella sp.* seguido por *Nannochloropsis sp.*, *Nannochloris sp.* y finalmente por *Spirulina sp.* deshidratada.

Se concluyó con base en los resultados de los parámetros número de rotíferos considerando huevos (rch), fecundidad, las determinaciones bioquímicas y a la facilidad del manejo de los cultivos, que *Nannochloropsis sp.* y *Nannochloris sp.* son alimentos adecuados para el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*.

### 1.1.- A B S T R A C T

Effect of food on the culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller: 1786) in a semicontinuous system.

Although the rotifer *Brachionus plicatilis* is not a natural food for marine fish, it has been intensively used due to its tolerance of wide limits of temperature and salinity, varied techniques of mass culture, small size, and reduced motility, that enables the fish larvae to prey on it when fish larvae can not capture other kinds of food.

Five foods of two types, alive and dead, dispensed in different ratios, were tested in the current study to determine the best ration for the stock. Later, biochemical analyses on the best ration were done, to obtain the best diet.

Of all food tested, **Nannochloris sp.**, with a density of  $25 \times 10^6$  cell/ml, produced the best yields, followed by **Nannochloropsis sp.**, with  $25 \times 10^6$  cell/ml, **Chlorella sp.** with  $35 \times 10^6$  cell/ml and finally lyophilized **Spirulina sp.** with density of 0.9 g/1.5 l volume. **Topal**, a commercial food, was assessed as deficient food. According to biochemical analysis (carbohydrates, proteins, lipids and gross energy) the best food in descending order was **Chlorella sp.**, **Nannochloropsis sp.**, **Nannochloris sp.** and lyophilized **Spirulina sp.**

Considering the above results on population variables, from biochemical analyses and from culture management, **Nannochloropsis sp.** and **Nannochloris sp.** are considered the most suitable food for the culture of **Brachionus plicatilis**.

## 2.- I N T R O D U C C I O N

La acuicultura en la actualidad es una fuente importante de producción de alimento, que contribuye a satisfacer la creciente demanda de proteína (Hepher y Pruginin, 1989). Además conlleva a una serie de actividades (producción, procesamiento, transporte y venta), generando empleos

En México la acuicultura nació como una actividad complementaria y de beneficio social para las comunidades rurales, con la cual sus habitantes podían incrementar el consumo de proteína animal y mejorar su nutrición (Juárez-Palacios, 1987).

La actividad acuacultural en México, ha estado enfocada preferentemente a las aguas continentales. El piscicultivo marino es una actividad que aún no se ha desarrollado, no obstante de ser una buena alternativa para la producción de carne de pescado. Debido a la extensión de la línea de costa del país y a la existencia de gran número de lagunas costeras, esta situación cobra mayor relevancia en los estados áridos, colindantes con el mar, que tienen agua dulce limitada (Matus-Nivón et al., 1990), tal es el caso de Baja California Sur.

En los cultivos intensivos, una de las etapas más críticas es la larvaria, momento en el que se observan las más altas mortalidades. Para que las larvas se desarrollen con éxito, se debe de disponer del alimento adecuado, tanto en cantidad como en calidad.

Los cultivos de apoyo (fito y zooplancton), utilizados como alimento para las larvas, siguen ocupando un sitio muy impor-

tante, ya que los alimentos artificiales no han conseguido aún las condiciones de calidad y precio que permitan sustituir a los alimentos vivos (Torretera, 1987).

El rotífero *Brachionus plicatilis* ha sido ampliamente utilizado dentro de la acuicultura como primer alimento para larvas de crustáceos y peces, debido a que cuenta con características tales como: capacidad de sobrevivencia en amplios intervalos de temperatura y salinidad (Lubzens, 1987); tamaño pequeño, movilidad reducida y un elevado contenido calórico, características que los convierten en presas vivas adecuadas para las larvas de peces (Theilacker y Kimball, 1984).

En la presente tesis se buscó definir con cuál alimento y en qué ración se producen los mayores rendimientos de rotíferos, así como su calidad nutricional.

### 3 . - A N T E C E D E N T E S

#### 3.1.- GENERALIDADES

El phylum Rotifera está constituido por microorganismos metazoarios, pseudocelomados, no segmentados, comúnmente conocidos como rotíferos (del latín rota: rueda; fera: transportar), debido a la presencia de una corona ciliar que poseen en la parte anterior.

Estos microinvertebrados son habitantes de ambientes acuáticos y semiterrestres, que pueden ser sésiles ó libres nadadores. El phylum Rotifera se encuentra formado por tres clases:

Seisonidea, Bdelloidea y Monogonta (Brusca y Brusca, 1990). Incluyendo esta última al género *Brachíonus*.

El rotífero planctónico *Brachíonus plícatílís* es quizá el representante más estudiado de este phylum. Su talla promedio se encuentra en un intervalo de 125 a 300 micras de longitud, cabe mencionar que esta talla difiere para la de los organismos provenientes de muestras naturales (Walker, 1981; Snell y Carrillo, 1984). Es un organismo filtrador de pequeñas partículas en la columna de agua, las cuáles atrae por medio de la corona ciliar; a su vez esta estructura también es utilizada para la locomoción (Fulks y Main 1992).

*Brachíonus plícatílís* puede reproducirse sexualmente (reproducción míctica o meiótica) o mediante reproducción asexual (reproducción amíctica o mitótica), la cual es más común. Los cambios ambientales tales como variaciones bruscas de temperatura y salinidad pueden inducir a la reproducción sexual (Fulks y Main *op. cit*).

### 3.2.- BREVE HISTORIA DEL CULTIVO DE ROTIFEROS

Japón fué el primer país que desarrolló investigaciones con el cultivo del rotífero *Brachíonus plícatílís*. Inicialmente estos microorganismos se consideraron como una plaga para el cultivo de anguila (*Anguilla japonica*), debido a la elevada velocidad de incremento poblacional lo que ocasionaba la degradación de la calidad del agua, provocando así la muerte de las anguilas (Lubzens, 1987; Fulks y Main 1992). En Japón este fenómeno se conoció como "mizukawari". Fué Ito (1955 y 1957)

quien observó que el rotífero *Brachionus plicatilis* podía ser utilizado como alimento para larvas de peces marinos y estableció las condiciones para su cultivo, utilizando como alimento a la microalga *Chlorella sp.* (Ito, 1960). A partir de este trabajo se han realizado gran cantidad de investigaciones, probando diferentes métodos de cultivo, diversas microalgas e inclusive alimentos inertes, así como la capacidad de las larvas de peces y crustáceos para consumirlos y el efecto que tienen sobre el crecimiento y sobrevivencia.

### **3.3.- CLASIFICACION DE LOS CULTIVOS**

Los cultivos tanto de microalgas como de otros microorganismos (rotíferos y copépodos entre otros) pueden dividirse con base en su volúmen, así como en la renovación del medio de cultivo y cosecha. De esta manera se puede hablar de cultivos experimentales en volúmenes pequeños, que generalmente se realizan en tubos de ensaye; cultivos a mediana escala, que se efectúan en volúmenes medios (litros) y cultivos a gran escala a nivel de tanques (de 1 a varias toneladas). Otra forma de dividirlos es considerando la renovación del medio de cultivo y la cosecha; de esta manera Lubzens (1987) divide los cultivos en: estacionarios o continuos, cultivos semicontínuos y cultivos retroalimentados.

#### **3.3.1.- CULTIVOS ESTACIONARIOS O CONTINUOS:**

Una de las características de los cultivos estacionarios o contínuos, es que los rotíferos se introducen en muy baja densi-

dad en un cultivo algal concentrado, y se realiza la cosecha una vez que las microalgas han sido consumidas en su mayoría. La duración de estos cultivos, así como la densidad de los rotíferos que se obtiene depende de la concentración de las microalgas y de la densidad inicial de los rotíferos. Cultivos de este tipo han sido trabajados por Vasil'eva y Okuneva (manuscrito), De la Cruz y Millares (1974), Gatesoupe y Luquet (1981), James y Salam (1987) entre otros.

### **3.3.2.- CULTIVOS SEMICONTINUOS:**

En los cultivos semicontinuos al igual que en los cultivos continuos se inocula una baja densidad de rotíferos en un cultivo denso de microalgas. Una vez que parte de estas microalgas son consumidas, se renueva parcialmente el medio agregando microalgas frescas o algún otro alimento. Este recambio se realiza en un período de 1 a 3 días; la fracción que se renueva se considera como cosecha. Después de varias cosechas el intervalo reproductivo decrece, debido probablemente a la acumulación de metabolitos excretados así como a la descomposición del alimento no consumido. En estas ocasiones se cosechan todos los rotíferos, los cuáles pueden ser utilizados como alimento o para inocular un nuevo cultivo. Con este tipo de cultivo se obtiene altos rendimientos por arriba de los 100 rot/ml (Lubzens, 1987). Un ejemplo de este tipo de cultivos son los realizados por Person-Le Ruyet (1975), Hirayama et al. (1979) y Hung (1989), entre otros.

### 3.3.3.- CULTIVOS RETROALIMENTADOS:

Los cultivos retroalimentados son los menos comunes, Hirata et al. (1983) describieron el mantenimiento de un cultivo de este tipo, en el cuál se obtienen altos rendimientos. En este cultivo los depósitos de materia orgánica y el agua de desecho, reciben un proceso de biofermentación y a su vez sirven como nutrientes para el cultivo de las microalgas. Los rendimientos obtenidos en este tipo de cultivo son mayores que los del control.

### 3.4.- TIPOS DE ALIMENTO

En cuanto a los tipos de alimento con los cuáles se han realizado los cultivos de rotíferos, están las microalgas, las levaduras, las bacterias y los alimentos inértres. En los cuadros 1 y 2 se presenta un resumen tanto de los tipos de alimento como del autor del trabajo.

#### 3.4.1.- MICROALGAS:

Las microalgas han sido el alimento más ampliamente utilizado (diferentes especies en varias concentraciones) como alimento en el cultivo de rotíferos, Ito (1960) probó *Chlamydomonas sp.*, *Dunaliella sp.*, y *Chlorella sp.*, encontrando que no existía un efecto significativo en el intervalo reproductivo al utilizar cualquiera de las tres cepas.

Sin embargo, otros autores indican que la concentración de las microalgas es un factor importante que afecta la respuesta poblacional del rotífero. En los trabajos de Hirayama y Ogawa (1972) se recomienda utilizar densidades celulares menores de

$213 \times 10^4$  cel/ml de "***Chlorella sp.***", ya que observaron que a estas densidades se presentaron los mayores intervalos de filtración, los cuales se incrementaron cuando los rotíferos tuvieron el estómago vacío.

Posteriormente Hirayama et al. (1979) probaron ocho microalgas diferentes, encontrando que el tipo de microalga y la densidad utilizada afectan tanto el intervalo reproductivo como la tasa de crecimiento instantáneo. En este estudio se evaluó a dos microalgas como excelentes ***Synechococcus sp.*** y ***Chlorella sp.***, cuatro como promedio ***Chlamydomonas sp.***, ***Monochrysis lutheri***, ***Dunaliella tertiolecta*** y ***Cycloptella cryptica*** y dos fueron encontradas como inadecuadas ***Nitzschia closterium*** y ***Eutriptella sp.***

El intervalo de filtración e ingestión pueden considerarse como medidas relacionadas con la conducta alimenticia y están influenciadas tanto por el tamaño y la forma de la microalga, así como por la composición bioquímica, el estado fisiológico y la concentración de células. Yúfera y Pascual (1985) observaron que con ***Nannochloris oculata***, ***Nannochloris maculata*** y ***Nannochloropsis maculata*** el intervalo de filtración disminuyó al incrementar la concentración de células alcanzando un nivel constante en 60 a 80  $\mu\text{g/ml}$ ; mientras que para la microalga ***Nannochloropsis gaditana*** el decrecimiento en el intervalo de filtración se presentó a concentraciones por arriba de 40  $\mu\text{g/ml}$ .

Uno de los trabajos que sin duda fueron fundamentales para el desarrollo de los cultivos de larvas de peces marinos, fué el de Theilacker y McMaster (1971) quienes realizaron cultivos de

rotíferos alimentándolos con ***Monochrysis lutheri***, ***Nannochloris sp.***, ***Exuviella sp.*** y ***Dunaliella sp.*** observando que los mayores rendimientos se obtuvieron con ***Dunaliella sp.*** y ***Monochrysis lutheri*** con 220 y 200 rot/ml respectivamente.

Un gran número de trabajos han utilizado la microalga ***Chlorella sp.***; investigaciones como las de Hirayama y Ogawa (1972) e Hirayama et al. (1973) conjuntamente con los trabajos realizados por Ito (1960) establecieron la pauta en el uso de la microalga ***Chlorella sp.*** marina, debido a que la evaluaron como un alimento adecuado para cultivo de rotíferos. Posteriormente Fukusho (1989) realizó la identificación correcta de la mencionada microalga, que corresponde a ***Nannochloropsis oculata***. En los restantes trabajos realizados fuera de Japón, en los cuales se utilizó ***Chlorella sp.***, es probable que en realidad se trate de esta microalga.

#### 3.4.2.- LEVADURAS:

Hirata y Mori (1967 en Fulks y Main 1992) fueron quienes descubrieron que la levadura de pan ***Saccharomyces cerevisiae***, se podía utilizarse como alimento para el cultivo de rotíferos. Con este alimento alternativo se ha tratado de evitar la dependencia de los cultivos de microalgas. El uso de la levadura presenta algunas ventajas sobre las microalgas: es más barata, accesible en el mercado y de fácil almacenamiento. No obstante Hirayama y Funamoto (1983) observaron que los rotíferos alimentados con ***Saccharomyces cerevisiae*** presentaban deficiencias de varios nutrientes. Esto fué corroborado por James et al. (1987) quienes

obtuvieron un porcentaje menor de lípidos y aminoácidos totales (26.12 y 22.6% respectivamente) comparados con los porcentajes encontrados utilizando *Cándida sp.* (34.87 y 32.51% respectivamente).

Whyte y Nagata (1990) encontraron que *S. cerevisiae* presenta sólo un 9.8% de lípidos totales, mientras que *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suécica* presentaron 15.8 y 13.1% respectivamente. Además de que los lípidos presentes en *S. cerevisiae* no se encontró la fracción w3 (ácidos grasos poliinsaturados) los cuáles son esenciales en el desarrollo de los peces marinos (Watanabe, 1982).

Debido al bajo valor nutritivo de la levadura de pan, se ha optado por mezclarla con *Chlorella sp.* (Rezeq y James, 1987) o con *Tetraselmis suécica* (Salvatore y Mazzola, 1981) con el fin de mejorar el valor nutritivo de los rotíferos y evitar de esta manera la degradación rápida del medio de cultivo.

#### 3.4.3.- ALIMENTOS INERTES:

Una de las características de los cultivos intensivos es el requerimiento de grandes volúmenes de microalgas, lo que implica elevados costos de producción. Una alternativa para disminuir los costos es buscar productos que las reemplacen, manteniendo además un rendimiento y calidad nutricional aceptable. Person-Le Ruyet (1975) utilizó como alimentos alternativos a las cepas *Spirulina sp.* deshidratada y *Scenedesmus sp.* liofilizada, encontrando que con *Spirulina sp.* deshidratada se mantuvo un cultivo de rotíferos con rendimientos medios a razón de 1500 mg por cada millón de individuos, mientras que con *Scenedesmus sp.*

se presentó la muerte progresiva del cultivo. Gatesoupe (1981) probó la cepa de ***Platymonas suecica*** en las formas seca y congelada, en salinidades de 18 y 35 ‰ y en volúmenes de 20 y 60 l; de estos ensayos encontró buenos rendimientos de 120 rot/ml en promedio en 18 ‰ de salinidad y 60 l de volumen. Otra alternativa que se ha utilizado es el alimento formulado **Topal** (alimento para rotíferos, producto de Belgica producido por **Artemia Systems N.V./S.A.**), el cual fué probado por Lubzens et al. (1990) para el mantenimiento de rotíferos a temperaturas de 4°C. Los resultados obtenidos se compararán con los de la levadura de pan *S. cerevisiae*, el cuál fué el alimento en el que se presentó un mayor intervalo reproductivo que con **Topal**.

Además de las alternativas mencionadas las dietas microencapsuladas surgieron como otra posibilidad viable. Teshima et al. (1981) utilizaron dos tipos de microencápsulados y los contrastaron con el alimento tradicional: ***Chlorella sp.***. Los alimentos microencapsulados cuando estuvieron almacenados, soportaron bien el cultivo de rotíferos únicamente en los tres primeros días al igual que con el alimento vivo. Sin embargo, cuando las microcápsulas se utilizarón recién preparadas el cultivo se mantuvo por nueve días, lo cual no representa ninguna ventaja ya que se requiere mano de obra constante al igual que en el mantenimiento de los cultivos de microalgas.

#### 4.- J U S T I F I C A C I O N

De la misma forma que la agricultura provee de fuentes energéticas los requerimientos cada vez mayores del hombre, la acuicultura, específicamente la maricultura puede contribuir a cubrir los mencionados requerimientos.

En México se piensa que el potencial pesquero es cinco veces mayor que el actual, nuestros mares y litorales son una reserva real, lo cuál no significa que sean inagotables. Así mismo México cuenta con 1.6 millones de hectáreas de litorales que incluyen tanto franjas costeras con una profundidad que no rebasa los 30 metros como por 12 500 Km<sup>2</sup> de lagunas costeras y esteros (Contreras, 1985) las cuales son zonas propicias para la acuicultura.

El cultivo de organismos marinos tiene cuarenta años de desarrollo en países como Japón, sin embargo, en México no se tiene una tecnología para el cultivo de peces marinos ni los recursos humanos necesarios para el desarrollo de la misma. En el CICIMAR-IPN se ha formado un grupo pionero en esta disciplina, cuyo objetivo es generar bases sólidas para el desarrollo del piscicultivo marino en nuestro país.

El cultivo de larvas de crustáceos y peces de interés comercial, presenta una gran demanda de alimento con el tamaño y la calidad nutricional adecuada, que permita una elevada sobrevivencia durante esta etapa. La utilización de alimentos vivos cultivados en laboratorio puede satisfacer dichas demandas.

Aunque el rotífero *Brachionus plicatilis* no forma parte de

la dieta natural de muchos peces marinos, se ha utilizado intensivamente, debido a las características que posee tales como: tolerancia a intervalos amplios de temperatura y salinidad, diferentes prácticas de cultivo masivo, un tamaño pequeño (125 - 300  $\mu\text{m}$ ) y una movilidad reducida. Lo cual le permite a las larvas de peces y crustáceos ingerirlos cuando aún no son capaces de capturar otro tipo de presas. El rotífero es un alimento ideal para una gran cantidad de larvas, el cual se utiliza cuando se inicia la alimentación exógena, etapa en la cual se presentan altas mortalidades si no se cuenta con el alimento adecuado. En la Figura 1 se pueden observar los intervalos de tiempo en los cuáles el rotífero es adecuado como alimento para larvas de peces de diferentes tipos, esta figura fué tomada de Hirayama 1985 y modificado con base en las experiencias que se han generado en el laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN.

En otros países se han realizado cultivos de peces de importancia comercial, usando como alimento de las larvas la misma especie de rotífero. El cuadro 3 resume algunos de estos trabajos, el criterio de selección de dichas publicaciones estuvo basado en que se tratan de experiencias a nivel de producción.

En el laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR se han obtenidos series de desarrollo de 19 especies de peces marinos y tres crustáceos (Ramírez et al, 1991), los cuáles han recibido como primer alimento el rotífero ***Brachionus plicatilis*** (en el cuadro 4 se mencionan algunas especies de peces, las

cuales se eligieron por su valor comercial). Como parte de las bases que deben de generarse para desarrollar el cultivo de peces marinos, se planteo la realización de un estudio para determinar con qué alimento y en que ración, se obtienen los mejores rendimientos (cantidad de individuos) y la mejor calidad nutricional en el cultivo de una cepa de rotíferos nativa. Además que no debemos de olvidar que todo conocimiento científico generado es valioso y posteriormente aprovechable por la tecnología, sin lo básico no se puede pensar en lo aplicado.

## 5. - 0 B J E T I V O G E N E R A L

El presente trabajo plantea encontrar el mejor alimento y la ración más adecuada para el cultivo del rotífero ***Brachionus plicatilis*** en un sistema semicontinuo.

### 5.1.- O B J E T I V O S P A R T I C U L A R E S

1) Realizar cinco bioensayos probando alimentos de dos tipos vivos e inertes, en diferentes raciones cada uno, en el cultivo del rotífero ***Brachionus plicatilis***.

2) Obtener la ración en la cuál el número de rotíferos considerando huevos y la fecundidad, sean óptimos para cada uno de los alimentos probados.

3) Realizar un bioensayo probando simultaneamente la mejor ración obtenidas para cada alimento, en el cultivo del rotífero ***Brachionus plicatilis***.

4) Obtener la composición bioquímica de los rotíferos cultivados con la mejor ración de cada alimento.

5) Obtener el alimento que genera rotíferos de mayor calidad nutricional.

## 6.1.- AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA

El material biológico utilizado en la realización del presente trabajo fué la cepa del rotífero *Brachionus plicatilis*, la cuál se obtuvo en enero de 1984, mediante una recolecta de muestras de agua en el oasis de San Pedrito B.C.S., México.

Las muestras de agua recolectadas fueron trasladadas al Laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN en La Paz, B.C.S. Se les distribuyó en diluciones de un cultivo de la microalga *Nannochloris sp.*, desarrollado en el medio de cultivo propuesto por Spectorova et al. (1982). La densidad aproximada del cultivo fué de  $50 \times 10^6$  cels/ml, y con una salinidad de 36<sup>o</sup>/oo. El cultivo de la microalga se diluyó a 6, 12, 18 y 24 <sup>o</sup>/oo de salinidad debido a que se consideró el carácter eurihalino del género *Brachionus*; posteriormente a cada dilución se le agregaron alícuotas de las muestras de agua obtenidas. Los recipientes de cultivo fueron frascos de vidrio de 500 ml de capacidad de forma cilíndrica con fondo plano, en un volúmen de cultivo de 400 ml. Estos cultivos se mantuvieron a  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , con una iluminación continua de 55 wats y aereación continua. Transcurridas 48 horas se observó que en las salinidades de 18 y 24 <sup>o</sup>/oo hubo proliferación de rotíferos. A partir de esta etapa se aplicó la técnica descrita por Theilacker y McMaster (1971), para la producción masiva de rotíferos, la que se modificó de acuerdo a las necesidades del laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR - IPN y que a continuación se detalla.

Debido a que los cultivos de microalgas se realizan en salinidades de 36<sup>o</sup>/oo, y en la misma forma se utilizan los rotíferos como intermediarios de la cadena trófica, la manutención de la cepa se realizó a 30<sup>o</sup>/oo y posteriormente se transfirió a 36<sup>o</sup>/oo, evitando de esta forma un choque osmótico para los rotíferos.

#### 6.2.- CONDICIONES DEL CULTIVO DE ROTIFEROS:

Actualmente la cepa de *Brachionus plicatilis* se mantiene en recipientes cilindro-cónicos de 2 l de capacidad en volúmenes de 1.5 l. Se utiliza agua de mar con una salinidad de 33 a 36 ‰, previamente tamizada a través de una malla de 20 micras. La aereación es continua y de fondo. La iluminación se abastece con lámparas de luz de día de 55 watts. La temperatura ambiental se encuentra entre 22 y 26<sup>o</sup> C con una temperatura promedio del medio de cultivo de 24 ± 2<sup>o</sup>C. La microalga utilizada como alimento en la manutención de la cepa del rotífero es *Nannochloris sp.* en un intervalo de densidad de 20 a 25 x 10<sup>6</sup> cel/ml. En la Figura 2 se observa el diagrama de flujo del mantenimiento y cultivo de la cepa del rotífero *Brachionus plicatilis*.

#### 6.3.- ALIMENTOS:

Para la realización del presente trabajo se utilizaron cinco alimentos clasificados en dos categorías: alimentos vivos y alimentos inertes. En la primera se utilizó a las microalgas frescas *Nannochloris sp.*, *Nannochloropsis sp.* y *Chlorella sp.*. Dentro de la segunda se empleó la microalga deshidratada

***Spirulina*** sp. proveniente de Sosa Texcoco, México y el alimento formulado **Topal** producido por **Artemia Systems N.V./S.A.** de Bélgica.

Las cepas de microalgas frescas fueron abastecidas por el cepario del laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR - IPN.

Los inóculos de las microalgas se mantuvieron en crecimiento en condiciones de esterilidad, a partir de tubos de agar inclinado transfiriéndose a volúmenes de 50, 100, 500 y 1500 ml. El agua de mar utilizada fué enriquecida con el medio Marino 1 (Cuadro 5) propuesto por González-Acosta y Ramírez-Sevilla (1987). Todos los cultivos de microalgas se mantuvieron en las mismas condiciones en que se mantiene el cultivo de rotíferos.

El agua utilizada para los cultivos en garrafón en volúmenes de 15 l y columnas de 50, 100 y 150 l, se tamizó por una malla de 20 micras y posteriormente para su esterilización se recirculó a través de un sistema de luz ultravioleta con un filtro integrado de 5 micras.

El número de células presentes por cada mililitro de cultivo, se contabilizó periódicamente mediante cuentas en la cámara de Neubauer ó hematocitometro. Así mismo se midieron los parámetros de la salinidad, la temperatura y el pH y en los casos en que fué necesario se ajustó la temperatura (de 23 a 25° C) y la salinidad (36°/oo). Los cultivos se utilizaron entre los días 16 al 21, momento en que de acuerdo a las experiencias generadas en el Lab. de Biología Experimental, se sabe que alcanzan la fase de crecimiento exponencial. Cuando la

densidad de células fué alta se diluyó con agua de mar o en el caso contrario se procedió a concentrar mediante centrifugación en frío.

Las cantidades de alimento utilizadas, para el caso de **Nannochloris sp.** estuvieron basadas en las experiencias inéditas de su manejo en el laboratorio, ya que esta microalga ha sido el alimento con el que se ha mantenido rutinariamente a la cepa de rotíferos. A partir de las densidades utilizadas se eligieron raciones más altas y más bajas con un intervalo de separación constante, siendo éstas de 10, 15, 20, 25, 30 y 35 x 10<sup>6</sup> cel/ml.

Para la microalga **Nannochloropsis sp.** las raciones a probar se eligieron siguiendo el esquema anterior, aunque sólo se habían utilizado ocasionalmente en el mantenimiento de la cepa del rotífero. Las raciones fueron de 15, 20, 25, 30 y 35 x 10<sup>6</sup> cel/ml.

En el caso de **Chlorella sp.** las raciones elegidas se basaron en los datos reportados por Rezeq y James (1987) así como en las máximas densidades de estos cultivos obtenidas en el laboratorio de Biología Experimental; probándose cinco raciones: 20, 25, 30, 35 y 40 x 10<sup>6</sup> cel/ml.

Para el alimento formulado **Topal se** siguieron las instrucciones del fabricante que indican que un gramo es equivalente a 2.9 x 10<sup>6</sup> cel/ml y se obtuvieron los pesos correspondientes a las raciones de **Nannochloris sp.** obteniendose 0.52, 0.77, 1.03, 1.30 y 1.50 g en 1.5 l de agua de mar.

Las raciones de la microalga deshidratada **Spirulina sp. se** obtuvieron con base a las recomendaciones de Person-Le Ruyet

(1975) adaptadas a nuestro volúmen de cultivo, las cuáles fueron 0.225, 0.450, 0.675, 0.900 y 1.125 g en 1.5 l de agua de mar.

El Cuadro 6 resume (para este trabajo) los alimentos con los cuales se realizó cultivo de rotíferos, así como las raciones que se probaron.

#### **6.4.- DETERMINACIONES BIOQUIMICAS DE LOS ROTIFEROS**

Para la realización de las determinaciones bioquímicas se tomaron muestras de 100 ml de los volúmenes de resuspensión antes mencionados. Los rotíferos presentes en estos volúmenes se recuperaron tamizándolos a través de una malla de 35  $\mu\text{m}$ , se les enjuagó con una solución 0.8 mM de NaCl (Gatesoupe, 1981) y se recuperaron con el menor volúmen posible de agua, que fué de entre 1.5 y 2 ml. La Figura 3 presenta el diagrama de flujo de las determinaciones bioquímicas.

##### **6.4.1.- DETERMINACION DE PESO SECO:**

El peso seco se determinó a partir de la pastilla celular, la cual se recuperó con ayuda de pipetas Pasteur y se colocó en los viales, que estaban a peso constante. Se incubaron a 80°C de temperatura, durante 24 h. Los pesos se determinarán en una balanza análitica Sauter.

##### **6.4.2.- DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS:**

Para la determinación de los carbohidratos, la pastilla celular se resuspendió en un mililitro de agua desionizada, utilizando para esta determinación 0.5 ml, dejando el otro 0.5 ml para la determinación de proteínas. Los carbohidratos se

cuantificaron por el método de Antrona (Dreywood, 1946) previa hidrólisis ácida con HCl 2N. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Milton-Roy a una absorbancia de 630 nm de longitud de onda. Como estándar se utilizó  $\alpha$ -D glucosa

#### 6.4.3.- DETERMINACION DE PROTEINAS:

Con el 0.5 ml restante obtenido de la resuspensión de la pastilla celular se procedió a aplicar la técnica colorimétrica de Lowry et al. (1951). Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro Milton-Roy a una absorbancia de 750 nm de longitud de onda. Como estándar se utilizó albúmina.

#### 5.4.4.- DETERMINACION DE LIPIDOS:

La extracción de los lípidos se inició con las muestras de los rotíferos, las cuáles se filtraron, enjuagaron y **resuspendieron** en el menor volúmen de agua posible. Posteriormente se les agregó la mezcla cloroformo: metanol (1:2), manteniéndose en refrigeración por 24h. Transcurrido este período se les centrifugó en frío a 4 000 rpm durante 10 min. Posteriormente se separaron las fases, siendo la inferior la fase **cloroformica** (la de los lípidos) y la pastilla celular la cual se utilizó para el análisis de proteínas y carbohidratos. Este proceso se repitió nuevamente, agregando previamente unas gotas de agua destilada y separando las grasas restantes.

Las fases lipídicas obtenidas con la mezcla cloroformo metanol (1:2), se pasaron a través de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, lavándolas por goteo con 3 ó 4 ml de cloroformo. Las fracciones obtenidas

se concentrarán a sequedad en el rotovapor a 55°C de temperatura. Estas se recuperarán diluyendo con cloroformo y se les transfirió a viales a peso constante, se agregaron unas gotas de una solución 0.02 % de Butilato de Hidroxitolueno (BHT) en cloroformo como antioxidante. Para conocer el valor de los lípidos totales las muestras se secaron con N<sub>2</sub> gaseoso y se pesaron en la balanza analítica.

## 6.5.- DISEÑO EXPERIMENTAL

### 6.5.1.- DETERMINACION DE LA RACION OPTIMA PARA CADA TIPO DE ALIMENTO.

El diseño experimental consistió en probar cinco diferentes alimentos, divididos en dos tipos: alimentos vivos en los que se incluyeron a las microalgas frescas **Nannochloris sp.**, **Nannochloropsis sp.** y **Chlorella sp.** y alimentos inértes como **Spirulina sp.** deshidratada y el alimento formulado **Topal**. En el caso de **Nannochloris sp.** se probaron seis raciones, en los cuatro bioensayos restantes se probaron en cinco raciones, en todos los casos cada ración se probó por duplicado.

Previo a la realización de los bioensayos los rotíferos fueron "precultivados" por tres días, en el mismo alimento en el que posteriormente se llevaría a cabo la experimentación. La Figura 4 representa el diseño experimental.

Para la realización de los bioensayos se partió de inóculos iniciales con 80 rotíferos por cada mililitro (considerando huevos), los cuales deberían de contar con fecundidades por

arriba de 1.0, lo cual nos garantizaba un estado saludable de la cepa. Después de 24 h de cultivo, los rotíferos se tamizaron a través de una malla de 35 micras, se resuspendieron y llevaron a un aforo de 500 ml de agua de mar previamente filtrada.

Para la evaluación de la población, se homogenizó la resuspensión y se tomó una alícuota de un mililitro, la cual se fijó con formol al 4%; contabilizándose los rotíferos presentes con ayuda de un microscopio estereoscópico y un contador diferencial de células. Las observaciones obtenidas fueron número de rotíferos considerando huevos (producción) y fecundidad promedio, el cálculo de estos valores se describe por Ramírez-Sevilla et al. (1991). El número de rotíferos considerando huevos (rch), se utiliza ya que es el número de hembras adultas teniendo en consideración a los huevos, los cuales debido al corto ciclo de vida de estos microorganismos, son individuos potenciales que en breve tiempo tendrán requerimientos similares a los de los adultos. La fecundidad es la relación del número de huevos en promedio por cada hembra, este parámetro, en la mayor parte de los casos nos indica el estado de salud del cultivo, ya que si los requerimientos alimenticios están siendo adecuadamente cubiertos, la fecundidad será alta. Así mismo se obtiene el volumen necesario para restablecer el inóculo. Cada bioensayo tuvo una duración de 16 días, este período se eligió teniendo en cuenta que es el tiempo máximo en que las larvas de peces requieren en forma constante a los rotíferos como alimento. El diagrama de flujo de el mantenimiento y cultivo de los rotíferos se explica en la Figura 2.

### **6.5.2.- DETERMINACIONES BIOQUIMICAS DE LAS RACIONES OPTIMAS PARA CADA TIPO DE ALIMENTO.**

Con la mejor ración obtenida para cada alimento, se realizó un nuevo bioensayo, en el cuál se probaron de manera simultánea todos los alimentos excepto **Topal**. Este experimento tuvo una duración de 16 días y se realizó por triplicado, siguiéndose la metodología anteriormente descrita, con la variante de que para cada volúmen de resuspensión se tomaron 100 mililitros, los cuales se utilizaron para realizar las determinaciones bioquímicas. En la Figura 3 se presenta el diagrama de flujo de las determinaciones bioquímicas.

## **6.6.- ANALISIS ESTADISTICO**

### **6.6.1.- OBTENCION DE LAS RACIONES OPTIMAS.**

La mejor ración para cada uno de los alimentos utilizados, se obtuvo mediante análisis estadísticos no paramétricos, siguiendo las técnicas descritas por Siegel y Castellan (1988).

Para detectar la existencia de diferencias significativas entre los duplicados (para cada ración en cada uno de los diferentes bioensayos), se aplicó la prueba de Wilcoxon. Se utilizó la prueba de Friedman de dos vías, buscando la existencia de diferencias en los valores de producción y fecundidad entre las raciones para cada tipo de alimento. Se realizaron comparaciones múltiples entre grupos definiéndose de esta manera aquellas raciones para cada uno de los diferentes alimentos, en las cuáles los rotíferos tenían respuestas poblacionales simi-

lares; obteniéndose de este modo las raciones óptimas. **Asímismo se graficaron** de los valores de producción y fecundidad por raciones, para los diferentes alimentos probados.

Con el fin de conocer la repetibilidad de los experimentos y consecuentemente la confiabilidad de los datos obtenidos, se aplicó una prueba **t** de Student para datos pareados, a los valores (producción y fecundidad). Estos valores provinieron de los bioensayos en los que se obtuvo la mejor ración para cada alimento, y se compararon con los resultados obtenidos en el bioensayo en que se experimentó simultáneamente con las mejores raciones de los diferentes alimentos.

#### **6.6.2.- DETERMINACIONES BIOQUIMICAS:**

En este trabajo se tomó en consideración las determinaciones bioquímicas de los rotíferos tratados con cada tipo de alimento, como un criterio más para definir el mejor alimento.

Con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre los triplicados, de los parámetros número de rotíferos considerando huevos (rch) y fecundidad, se realizó la prueba de Cochran.

Para determinar con cuál de los diferentes alimentos probados se producen rotíferos de mejor calidad nutricional, a las matrices de datos obtenidas para peso seco, carbohidratos, proteínas y lípidos, se les aplicaron los siguientes análisis **estadísticos**: para establecer si existen diferencias entre las concentraciones de los componentes bioquímicos (peso seco, **carbohidratos**, proteínas y lípidos), se aplicó un análisis de

variancia de dos vías con repeticiones (Sokal y Rohlf,1982) donde el factor A corresponde a los diferentes alimentos y el factor B a los días. Con el fin de valorar, cuál alimento es el que aportó el mayor contenido de peso seco, **carbohidratos**, proteínas y lípidos totales, se realizó una prueba **Andeva** con comparaciones planeadas de las medias; confrontando los dos tipos de alimento (vivo contra inerte). Se realizaron las gráficas de las medias y las desviaciones estándar de los peso seco, los carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales por dieta. Así mismo se cuantificó el valor energético (Nat. Res. Coun. 1983) de cada uno de los alimentos.

Con el fin de conocer la variación de los diferentes componentes bioquímicos a lo largo del período experimental, se graficaron el peso seco, los carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales por áreas para cada alimento.

En el Cuadro 7 se resumen las diferentes pruebas estadísticas que se aplicaron, así como los correspondientes intervalos de confianza con los que se trabajo.

## 7.- R E S U L T A D O S

### 7.1.- DETERMINACION DE LA RACION OPTIMA PARA CADA TIPO DE ALIMENTO.

Al aplicarse la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados a los alimentos probados, se encontró que éstos no varían significativamente, esta prueba se realizó con un ( $P < 0.05$ )

Tras haber comprobado la no variación de los duplicados y haberlos promediado, se realizó una prueba de Friedman de dos vías ( $P < 0.05$ ). Los valores obtenidos mostraron la diferencia significativa (entre el número de rotíferos considerando huevos y la fecundidad) de al menos una de las raciones en los diferentes tratamientos, que fue la menor ración. Excepto para el caso de *Chlorella sp.*, por lo que se deduce que no existe diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la producción (rch) y la fecundidad para las diferentes raciones probadas de esta microalga.

Las comparaciones múltiples entre grupos permitieron definir, la ración que en términos poblacionales resultó más adecuada. Para los tratamientos de *Rannochloropsis sp.*, *Nannochloris sp.* y *Spirulina sp.* si fué posible establecer la ración óptima: siendo ésta para *Nannochloropsis sp.* de  $25 \times 10^6$  cel/ml, para *Nannochloris sp.*  $25 \times 10^6$  cel/ml y de 0.900 g/1.5 l en el caso de *Spirulina sp.*.

Con lo que respecta a *Chlorella sp.*, se encontró un comportamiento muy homogéneo en todas las raciones, por lo que se optó por elegir la ración que presentó un valor promedio de producción y fecundidad más alto, el cuál fué de  $35 \times 10^6$  cel/ml.

Debido a los deficientes resultados obtenidos en todas las raciones probadas del alimento formulado **Topal**, desde los primeros días, en los que se observó la rápida declinación y muerte de la población a niveles muy por debajo de los inóculos iniciales, la evaluación de este alimento sólo se realizó hasta esta etapa.

En la Figura 5 se observa el comportamiento poblacional de los rotíferos en términos de producción, cuando se les cultivó con alimentos vivos. En el caso de las microalgas **Nannochloris sp. y Chlorella sp.**, existe una declinación del número de rotíferos inicial, el cuál fué más marcado para el caso de **Chlorella sp.**, cuyo período de adaptación al alimento tiene una mayor duración. En ambos tratamientos, el comportamiento de las curvas presenta mayores variaciones, siendo éstas más evidentes en **Chlorella sp.** que en **Nannochloris sp.** Para la microalga **Nannochloropsis sp.** se aprecia que las curvas de las diferentes raciones presentan poca variación, siendo las tres raciones más altas muy similares y muy estables.

La Figura 6 muestra a los rotíferos que fueron tratados con alimentos inertes. En el caso del alimento formulado **Topal** se muestra una declinación abrupta del cultivo, a partir del tercer día en todas las raciones probadas. En el tratamiento **Spimlina sp.** en las dos raciones más bajas se evidencia una respuesta poblacional menor que el resto de las raciones. Las curvas de las diferentes raciones presentan un comportamiento estable, especialmente la ración más alta (1.125 g/1.5 l). A partir de la ración 0.675 g/1.5 l en adelante no se incrementan

notoriamente los valores de producción.

La Figura 7 corresponde a los valores de fecundidad de los alimentos vivos por raciones. En ella se observa que la microalga **Nannochloris sp.** se presenta un comportamiento estable, especialmente con la ración  $20 \times 10^6$  cel/ml, sin embargo, la ración elegida mediante análisis estadísticos como la más adecuada fué la de  $25 \times 10^6$  cel/ml que a pesar de ser menos constante es más alta en los valores de fecundidad. En el caso de la microalga **Chlorella sp.** se manifiesta para todas las raciones una respuesta poblacional con mayores variaciones y en promedio con valores más bajos de fecundidad que los de las otras dos microalgas. Para **Nannochloropsis sp.** se observa que mantiene un comportamiento muy estable a lo largo de los 16 días de experimentación, siendo tal comportamiento muy claro en la ración de  $25 \times 10^6$  cel/ml.

En la Figura 8 se comparan las fecundidades de los alimentos inértres. Con el alimento formulado Topal se observa que para todas las raciones se presentan un marcado descenso en los valores de fecundidad y la declinación total del cultivo en las dos raciones más altas. En las raciones restantes se presentan algunos picos, producto de una relación de muy escasas hembras y un número mayor de huevos.

Con la microalga **Spírulína sp.** deshidratada, los rotíferos aumentaron paulatinamente sus valores de fecundidad conforme la ración aumenta, siendo estos valores máximos en la ración de 1.125 g.

Con base al número promedio de rotíferos (producción) y fecundidad obtenidos para las raciones encontradas como las más adecuadas, se puede decir que a una densidad de  $25 \times 10^6$  cel/ml de **Nannochloris sp.** se obtienen los mayores rendimientos, alcanzando los 233.4 rot/ml, con una fecundidad promedio de 1.05. En segunda posición se encuentra la microalga **Nannochloropsis sp.**, con la cual se obtuvo un promedio de 193 rot/ml, con una fecundidad de 0.99 a una densidad de  $25 \times 10^6$  cel/ml. Con **Chlorella sp.** a densidades de  $35 \times 10^6$  cel/ml el rendimiento promedio fué de 150 rot/ml con una fecundidad de 0.71 y finalmente con **Spirulina sp.** deshidratada 0.9 gramos en 1.5 l se lograron 79 rot/ml con una fecundidad de 0.60.

La confiabilidad de los resultados se hizo evidente al comparar los valores de producción (número de rotíferos por mililitro) y fecundidad (relación huevos/hembra), obtenidos para las mejores raciones en el bioensayo en el cual se experimentaron todos los alimentos simultáneamente no encontrándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## 7.2.- DETERMINACION BIOQUIMICA DE LAS RACIONES OPTIMAS.

Al aplicar la prueba de Cochran, se observó que no existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el número de rotíferos considerando huevos y en la fecundidad, para los triplicados de cada una de las dietas (**Nannochloris sp.**, **Nannochloropsis sp.**, **Chlorella sp.** y **Spirulina sp.**), durante el bioensayo en el cual se probarón de forma simultánea.

Las comparaciones de los análisis de variancia entre las mejores raciones obtenidas para cada tipo de alimento; indican la existencia de diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre los pesos secos, los carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales obtenidos. Sin embargo, en el caso del peso seco los días y la interacción no fueron significativos ( $P < 0.05$ ). Para el resto de los componentes, estas diferencias se hicieron evidentes en función de los días de la siguiente forma: muy significativa ( $P < 0.01$ ) para las cantidades de los carbohidratos y las proteínas y significativas ( $P < 0.05$ ) para los lípidos totales. La interacción no fue significativa ( $P < 0.05$ ) para ninguno de los componentes bioquímicos.

Al comparar los valores promedios de los pesos secos, los carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales para los alimentos probados, por medio de un análisis de variancia con comparaciones planeadas de las medias, confrontando los tipos de alimento (vivo vs. inerte), obtenemos que existe una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre las medias de los pesos secos de los dos tipos de alimento. En el caso de los carbohidratos las diferencias fueron muy significativas ( $P < 0.01$ ) y para las proteínas y los lípidos totales estas fueron altamente significativas ( $P < 0.001$ ).

Así mismo al realizar la comparación entre los alimentos vivos, se observa que estos varían significativamente ( $P < 0.05$ ) en el caso de los pesos secos. Por su parte los carbohidratos presentan una variación altamente significativa ( $P < 0.001$ ), las proteínas se diferenciaron de forma muy significativa ( $P < 0.01$ ), en tanto que los lípidos totales no presentaron diferencias.

Al agrupar las cepas **Nannochloris sp. y Nannochloropsis sp.** con base al tamaño y compararlas contra **Chlorella sp.**, se nota que no existe diferencia entre sus respectivos pesos secos, ni en las concentraciones de los carbohidratos y los lípidos totales, sin embargo, las proteínas sí presentaron diferencias muy significativas ( $P < 0.01$ ).

Se realizaron comparaciones entre las microalgas **Nannochloris sp. y Nannochloropsis sp.**, evidenciándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre sus pesos secos. En cuanto a las concentraciones de los carbohidratos, existen diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ), mientras que por su parte las proteínas y los lípidos totales no presentaron variación. Los valores de las sumas de cuadrados, los valores de F calculados y la significancia se observan en los Cuadros 8-11 para las determinaciones del peso seco, los carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales.

Las Figuras 9-12 representan gráficamente los valores de las medias y sus desviaciones estándar, para los pesos secos, los carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales. En la Figura 9 se advierte que dentro de los diferentes alimentos la microalga **Spirulina sp.** presenta el mayor valor de peso seco, seguida por **Nannochloris sp., Chlorella sp. y Nannochloropsis sp.**

Por su parte la representación gráfica de los carbohidratos (Figura 10) muestra una concentración máxima para los rotíferos que fueron tratados con **Spirulina sp.**, la que disminuye en **Nannochloris sp., Chlorella sp. y Nannochloropsis sp.**

Las concentraciones medias de proteínas encontradas para los

diferentes alimentos se observan en la Figura 11. En donde nuevamente el alimento *Spirulina sp.* mantiene el valor más alto seguido por *Nannochloris sp.*, *Uannochloropsis sp.* y finalmente por *CNorella sp.*.

La Figura 12 corresponde a los valores medios y desviaciones estándar de las cantidades de lípidos totales encontradas en los rotíferos alimentados con los diferentes tratamientos. El mayor valor medio fué el de la microalga *Chlorella sp.* que es muy semejante al de *Nannochloropsis sp.* seguido de *Nannochloris sp.* y *Spirulina sp.*.

La Figura 13 (a, b, c y d) se presentan los porcentajes de los carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales para los diferentes alimentos. Se observa en estas gráficas que *Nannochloris sp.* presenta el mayor porcentaje de carbohidratos con 24.6%. En tanto que las microalgas *Spirulina sp.*, *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis sp.* tienen 22.8, 22.5 y 19.4% de carbohidratos respectivamente.

En los porcentajes de proteínas el orden descendiente es: *Spirulina sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Nannochloris sp.* y *CNorella sp.* con 70.7%, 64.9%, 59.9% y 56.5% de proteínas respectivamente.

En cuanto a los lípidos totales los porcentajes presentes en los cuatro alimentos son: 20.9% para *Chlorella sp.*, 15.7% para *Nannochloropsis sp.*, 15.5 para *Nannochloris sp.* y 6.5% para *Spirulina sp.*.

Los valores energéticos calculados con la fórmula del National Reserch Council (1983) fueron 0.6124 Kcal/Kg para *CNorella sp.*, 0.5985 Kcal/Kg en el caso de *Nannochloropsis sp.*,

de 0.5890 Kca/Kg para **Nannochloris sp.** y de 0.5580 Kcal/Kg en **Spirulina sp.**

Las Figuras 14-17 representan los componentes bioquímicos antes mencionados así como su variación diaria a lo largo del periodo de experimentación, para cada uno de los alimentos probados.

En las cuatro gráficas se puede observar que en los días 1 y 2 se lleva a cabo la aclimatación a los alimentos utilizados. Posteriormente el patrón de comportamiento varía para cada alimento, a pesar de que los bioensayos se realizaron de forma simultánea, en las mismas condiciones de temperatura, salinidad, iluminación y edad de los cultivos. Sin embargo, dentro de cada tratamiento los componentes bioquímicos conservan la misma tendencia, es decir que los incrementos y decrementos en las cantidades de los carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales son simultáneos.

En la Figura 14, se grafica el comportamiento de los componentes bioquímicos de los rotíferos alimentados con **Nannochloropsis sp.**; en donde observa un patrón de respuesta muy estable, manteniéndose la proporción de peso seco, los carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales, existiendo dos picos en los días diez y quince.

Para la microalga **Nannochloris sp.**, (Figura 15) se observa la existencia de una variación considerable, con dos marcados picos en los días cinco y catorce, además de algunos picos menores. Asimismo existe un elevado contenido de carbohidratos en el período comprendido entre los días uno y cinco. Para los días

trece al quince se presenta un bajo contenido de lípidos totales.

En el caso de la microalga *Chlorella sp.* (Figura 16) se observa un comportamiento muy estable, tanto en la proporción de los diferentes componentes bioquímicos, como en el comportamiento poco sinuoso que presentan en su conjunto. En los días uno al ocho existe una proporción ligeramente mayor de carbohidratos.

Para el alimento inerte *Spirulina sp.* (Figura 17) el comportamiento de los componentes bioquímicos es muy variable. Teniendo de esta manera que en el período comprendido entre los primeros diez días, es mayor la proporción de peso seco, los carbohidratos y las proteínas, con un marcado pico en el día cinco. Posteriormente existe una declinación de todos los componentes con dos puntos más bajos en los días once y trece; en los siguientes días el patron de comportamiento se vuelve ascendente. A lo largo del período experimental se observa que la proporción de lípidos totales se mantiene constante.

## 8.- D I S C U S I O N

### 8.1.- DETERMINACION DE LA RACION OPTIMA PARA CADA TIPO DE ALIMENTO.

Los cultivos de rotíferos realizados en el presente trabajo, se consideran cultivos semicontínuos, a pesar de no existir una renovación parcial del medio de cultivo; sin embargo sí existe un recambio periódico (diario) de las microalgas. Los rotíferos así cultivados, son utilizados en parte como alimento para las larvas de peces y la otra es utilizada como inóculo, con el cuál se reestablece el cultivo. Estos cultivos también pueden considerarse como cultivos a mediana escala, no tanto por el volúmen ya que es reducido (1.5 l), sino por los rendimientos obtenidos en esta forma, que se consideran altos. Además de que los rotíferos producto de los diferentes bioensayos, se utilizaron como alimento para larvas de peces.

La comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con trabajos previos representa cierta dificultad, ya que en algunos casos en las referencias bibliográficas no se aclaran todos los datos del cultivo, como son: las densidades de microalgas que se dan al cultivo de rotíferos, los volúmenes de cultivo, las temperaturas a las que se les mantuvo, entre otros. Asimismo la evaluación de los resultados se realiza mediante diferentes métodos tales como el intervalo intrínseco de crecimiento ( $R_0$ ) (Hirayama et al., 1979) o a través de evaluaciones indirectas del crecimiento de las larvas de peces

(Theilacker y McMaster, 1971), en este trabajo utilizamos la producción de rotíferos y la fecundidad.

En el presente trabajo se probaron dos tipos de alimento: el vivo e inerte, el primero es el que normalmente usan los rotíferos en el medio natural. No obstante, con la manipulación de estos organismos en condiciones de laboratorio se han probado fuentes de alimento alternativas, debido a que la producción de las microalgas requiere de mayores costos (condiciones de temperatura controlada, luz **continua**, **aereación**, nutrientes, mano de obra y otros). Algunas de estas opciones son el alimento inerte y/ó las dietas formuladas, algunas de las cuáles están disponibles en el mercado. La utilización de alimentos de este tipo en la realización del presente trabajo, sirvió para conocer la factibilidad de utilizar un alimento alternativo, en el cuál se busca que sin disminuir la calidad del producto terminal (rotíferos) permita reducir los costos. Contrastandolo con el alimento vivo, el cuál además de ser el normalmente utilizado, se sabe que cuenta con la calidad nutricional adecuada para sostener el cultivo de rotíferos.

#### **8.1.1.- *Chlorella sp.***

Dentro de los alimentos vivos que se probaron, la microalga ***Chlorella sp.*** ha sido ampliamente utilizada, en un amplio intervalo de densidades y bajo diversas condiciones. Cabe aclarar que la microalga usada en el presente trabajo, corresponde a la identificación de ***Chlorella*** y al mencionar a la microalga tipo "***Chlorella***" del Japón, se hace referencia a su correcta

identificación **Nannochloropsis** (Fukusho, 1989).

En este trabajo se observó que la densidad de rotíferos se incrementaba poco al aumentar la concentración de *Chlorella sp.*, entre las diferentes raciones, manteniendo un comportamiento muy estable. Esto puede deberse a que una vez que se alcanza el máximo intervalo de ingestión, las microalgas no son consumidas. Yúfera (1985) observó que a bajas densidades de células, el intervalo de filtración e ingestión se incrementa, sin embargo, al aumentar la densidad de células el intervalo de filtración decrece y la ingestión se mantiene constante. Lo anterior es contrario a lo encontrado por Rezeq y James (1987), quienes observaron un incremento de la densidad poblacional conforme se incrementa la concentración de la microalga. Estos autores encuentran que en la ración de  $37 \times 10^6$  cel/ml, el tiempo de duplicación es mínimo y la tasa de crecimiento instantáneo es máxima. En nuestro trabajo se observó el más alto valor de producción (rotíferos considerando huevos) a una densidad de  $35 \times 10^6$  cel/ml y fecundidad de 1.05; el valor de producción es cercano al obtenido por Rezeq y James (1987).

Por su parte Person-Le Ruyet (1975) coincide con Rezeq y James (op. cit.), al observar que el incremento en la disponibilidad de la microalga incrementa la densidad poblacional, obteniendo 180 rot/ml con una densidad de  $65 \times 10^6$  cel/ml de ***Chlorella sp.*** y de 140 a 150 rot/ml en volúmenes de 4 y 3 l respectivamente. En nuestras experiencias obtenemos un promedio de 150 rot/ml, con una densidad de ***Chlorella sp.*** bastante menor de  $35 \times 10^6$  cel/ml en un volumen de 1.5 l.

Por su parte Hung (1989) utilizando la misma microalga,

obtiene rendimientos de 136.8 y 142.2 rot/ml en condiciones de laboratorio y en exteriores respectivamente. Sin embargo, esta autora considera bajos los rendimientos mencionados, al compararlos con los 195.3 y 215 rot/ml obtenidos con *Tetraselmis chuii*. Los rendimientos que obtuvimos con *Chlorella sp.*, tampoco fueron los mejores ya que con *Nannochloris sp. se* alcanzó una producción de 233.4 rot/ml.

Vasil'eva y Okuneva (manuscrito) manteniendo un cultivo estacionario obtienen rendimientos de *B. mbens*, de 20 y 25 rot/ml, alimentándolos con *Chlorella sp.* en densidades iniciales de  $10 \times 10^4$  cel/ml. Estos cultivos los realizan en tanques de concreto de 3 a 4 toneladas de capacidad, en volúmenes de 400 y 500 l, en condiciones de fotoperíodo y temperatura naturales. Los rendimientos obtenidos por estos autores son bajos, sin embargo al considerar el volumen en que se realizan estos cultivos se observa una cantidad importante de rotíferos. Esta densidad debe de estar influenciada por la presencia de bacterias que en última instancia son fuente de alimento para los rotíferos, ya que las concentraciones iniciales de la microalga utilizada son muy bajas (Ushiro et al. 1980 en Lubzens 1987).

Snell (1983) observó un buen intervalo reproductivo de 1.24 al utilizar *Chlorella sp.* como alimento para rotíferos en una concentración de 0.5 mg/ml. En nuestra experiencia la fecundidad no vario entre las diferentes raciones probadas y su valor fué considerablemente menor (0.71) que el observado por Snell (op. cit.), sin embargo debe de tenerse en cuenta que no se están comparando las concentraciones de microalgas. Este mismo autor

también observó que las mezclas de **Schizothrix sp.** y **Chlorella sp.**, incrementaban un promedio de 2.7 veces el intervalo reproductivo al compararlo con las dietas monoespecíficas. Esto parece razonable ya que al combinar dos tipos de microalgas se pueden abastecer mejor los requerimientos nutricionales de los rotíferos.

Por su parte Ben-Amotz y Fishler (1982) probaron cuatro especies de **Chlorella**: que fueron **C. marina**, **C. salina**, **C. ovalis** y **C. stigmatophora**, a nivel de tubo de ensaye y en densidades de 1 y 2 x 10<sup>6</sup> cel/ml. Encontraron que las cuatro microalgas eran una dieta pobre para los rotíferos. En el mismo trabajo se observó que los resultados fueron mejores con **Nannochloris oculata** a densidades de 7.5 a 15 x 10<sup>6</sup> cel/ml. Los resultados de estos autores están de acuerdo con lo encontrado en nuestras experiencias, ya que **Nannochloris sp.** fué el alimento con el que se obtuvieron los más altos rendimientos seguido de **Chlorella sp.** con la cuál solo se obtuvieron rendimientos medios.

#### **8.1.2.- Nannochloris sp..**

Cuando la microalga **Nannochloris sp.** se utilizó en una densidad de 25 x 10<sup>6</sup> cel/ml, se obtuvieron rendimientos promedio de 233.4 rot/ml con una fecundidad 1.05, los cuáles fueron los valores más altos encontrados de los alimentos probados. Por su parte Hung (1989) obtuvo rendimientos de 183 rot/ml en una densidad de 20 x 10<sup>6</sup> cel/ml de **Nannochloris oculata**, los cuáles fueron menores a los obtenidos en este trabajo a esa misma concentración de microalgas (213 rot/ml). Theilacker y McMaster (1971) obtuvieron una producción de 152 rot/ml a una

concentración de  $4 \times 10^6$  cel/ml con una fecundidad de 1.0 en volúmenes de 2 l. La concentración de la microalga utilizada por estos autores fué mucho menor que la ración más baja probada en este trabajo ( $10 \times 10^6$  cel/ml) a pesar de que los volúmenes de cultivo son semejantes, no se realizaron comparaciones.

Las concentraciones de ***Nannochloris sp.*** afectaron tanto los valores de fecundidad como de producción, ya que la ración más baja y las dos más altas tuvieron valores menores en los parámetros observados que en las raciones intermedias; entre las cuáles se encontró la mejor ración  $25 \times 10^6$  cel/ml. Yúfera y Pascual (1985) observaron que los intervalos de filtración e ingestión están determinados tanto por la concentración como por el tipo de microalga. Con ***Nannochloris maculata***, ***Nannochloris oculata*** y ***Nannochloropsis gaditana*** el intervalo de filtración decreció al incrementarse la concentración de la microalga, alcanzando un nivel constante de 60 a 80  $\mu\text{g/ml}$ . Lo encontrado por estos autores coincide de alguna forma con lo observado en este trabajo, ya que nuestros resultados revelaron un intervalo de concentración de la microalga (de 15 a  $25 \times 10^6$  cel/ml) en el cuál el crecimiento poblacional es óptimo. Sin embargo, una vez que se rebasan estas concentraciones la fecundidad y el número de rotíferos decae, lo cual puede ser el resultado de un mayor desgaste provocado por una mayor actividad de filtración y una menor ingestión.

### 8.1.3.- *Nannochloropsis sp.*

En cuanto a la microalga *Nannochloropsis sp.* existen pocos trabajos con los cuales se pueda comparar los resultados obtenidos. Si bien están las experiencias realizadas por Hirayama y Ogawa (1972), así como por Hirayama et al. (1973), quienes recomiendan la utilización de *Nannochloropsis sp.* en densidades menores a  $2.13 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ , con una densidad óptima de  $1.5 \times 10^6 \text{ cel/ml}$  en la cuál obtienen los intervalos más altos de reproducción e intervalo intrínseco de crecimiento poblacional. Además del trabajo de Hirayama et al. (1979) en donde se evaluaron ocho especies de fitoplancton, entre ellas *Nannochloropsis sp.*, que resultó ser un excelente alimento para el cultivo de rotíferos. Los resultados obtenidos por estos autores, no son comparables con los nuestros, ya que las densidades de microalga que se usaron son muy bajas, además de que los experimentos se realizaron a nivel de tubo de ensaye con 2 a 5 ml de medio. Sin embargo, si coincide con lo que encontramos en el presente trabajo, ya que si bien *Nannochloropsis sp.* no fué el alimento con el cual se obtuvieron los mayores rendimientos, fué el segundo mejor con 193 rot/ml y una fecundidad de 0.99, por lo cuál puede decirse que esta microalga mantiene bien el cultivo de rotíferos.

### 8.1.4.- *Spirulina sp.*

Con respecto a la microalga deshidratada *Spirulina sp.* la ración evaluada como óptima es mucho mayor a la recomendada por Person-Le Ruyet (1975) quien con 0.2 g/l obtiene rendimientos de 145 rot/ml en cultivos de 20 l, en nuestros experimentos

utilizando el triple de la ración recomendada por este autor, o sea 0.6 g/l, se producen 80 rot/ml en un volúmen de 1.5 l. La diferencia en los rendimientos puede ser provocada tanto por el volúmen (20 l) como por la forma de mantenimiento del cultivo, al que se le extrae diariamente un cuarto del volúmen, existiendo una fracción que permanece y en la que se acumulan tanto excreciones de los rotíferos como alimento en descomposición, lo cuál genera bacterias que sirven de alimento a los rotíferos. Los rendimientos generados por Person-Le Ruyet son 1.8 veces mayores que los que obtuvimos en este trabajo.

Para evitar la sedimentación de la *Spirulina sp.*, se siguieron las indicaciones de Person-Le Ruyet (1975) y cada una de las raciones se dividió en dos partes; una que fué aplicada por las mañanas posteriormente al recambio del medio y otra por las noches. A pesar de estas medidas, se presentó la sedimentación, la que debe de ser considerablemente mayor si se aplica toda la ración en una sóla dosis. Ante estas situaciones sería recomendable idear alguna forma de aplicación del alimento que fuera continua, para tratar de mantener el alimento en la columna de agua y de esta forma los rotíferos lo pudieran consumir.

#### 8.1.5.- TOPAL.

De acuerdo a los resultados obtenidos el alimento formulado **Topal** demostró una baja calidad en el mantenimiento del cultivo de rotíferos, debido a que durante la utilización de este alimento se observó una escasa estabilidad, la cuál se manifestó por el cambio de color que en un principio era rosa y con un

olor dulce; a una coloración blanca, con una consistencia lamosa y olor a harina de pescado, que se observó después de 8 h. Ramón Manríquez (com. pers.) coincidió con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que él observó una respuesta muy similar de este producto al utilizarlo como alimento para el cultivo de rotíferos. Por su parte Lubzens et al. (1990) obtuvieron mejores resultados con la levadura *S. cerevisiae* que con el **Topal** en el mantenimiento de una cepa de rotíferos a 4° C. Este autor no menciona problemas en la estabilidad del producto, lo que quizá no representó un problema, debido a la baja temperatura en que realizó su experimentación. Sin embargo a 24 ° C temperatura media en la que efectuamos este trabajo y el de Ramón Manríquez, la descomposición del alimento **Topal** fué acelerada.

Tomando como criterio para la evaluación de los alimentos probados, únicamente la respuesta poblacional de los rotíferos, el mejor alimento es *Nannochloris sp.* seguido en orden descendente por *Nannochloropsis sp.*, *Chlorella sp.* y *Spirulina sp.*, en tanto que el alimento formulado **Topal** no se recomienda, en las condiciones en que se realizó este estudio.

## **8.2.- DETERMINACIONES BIOQUIMICAS:**

Durante la vida temprana de las larvas de peces marinos, la energía metabólica (lípidos, proteínas y carbohidratos) depende de las fuentes endógenas para los embriones y exógenas para las larvas; por lo que se requiere un aporte y oxidación eficiente de los nutrientes para poder satisfacer todos los procesos celulares (metabolismo, crecimiento y excreción) (Pionetti et al.

1986).

Los rotíferos se han utilizado con bastante éxito como primer alimento de las larvas de peces, etapa que es crítica, ya que si no se cuenta con el alimento en la cantidad y con la calidad adecuada se presentan altas mortalidades.

Para poder evaluar el efecto de cada tipo de alimento en los rotíferos se consideraron las determinaciones bioquímicas de los rotíferos, como un criterio más para definir el mejor alimento.

El conocimiento de las peculiaridades e intervalos de variación de la composición bioquímica de los organismos utilizados como alimento vivo, es necesario para escoger el método más apropiado para incrementar su calidad nutricional. Recientemente las investigaciones en nutrición con rotíferos han considerado importante no sólo conocer la cantidad de rotíferos que se pueden obtener con un determinado alimento, sino también la calidad nutricional de estos microinvertebrados (Frolov, et al. 1991).

Frolov y colaboradores (op. cit.) investigaron la influencia de la composición bioquímica de los diferentes tipos de alimento en la calidad nutricional de los rotíferos, encontrando que ésta depende de la composición bioquímica del alimento utilizado.

La mayoría de las referencias en las que se realizaron análisis bioquímicos, son trabajos finos en los cuáles se hace la caracterización tanto de los aminoácidos y lípidos, dedicando un espacio muy reducido a los carbohidratos. Esto se debe a que aunque los carbohidratos aportan una significativa fuente de energía y son componentes de los metabolitos celulares tales como

la glucosa en sangre, nucleotidos o glicoproteínas, no son nutrientes esenciales.

La comparaciones de los resultados con las referencias bibliográficas, en cuanto a los análisis bioquímicos, se puede calificar como pobre, ya que los escasos trabajos realizados en este tópico utilizan alimentos diferentes a los probados en esta investigación, pudiendo sólo establecer comparaciones como alimento vivo. Además de que las técnicas utilizadas en las diferentes citas, son a nivel de cromatografía de gases, para determinar las diferentes fracciones y porcentajes de los aminoácidos y los lípidos.

#### **8.2.1.- PESO SECO.**

El peso seco es una medida de la biomasa, es decir, la cantidad de materia orgánica aprovechable una vez descartada el agua. El peso seco de los rotíferos tratados con la microalga deshidratada ***Spirulina sp.*** fué considerablemente mayor con respecto al resto de los alimentos. Esto pudo deberse al mayor tamaño de las **celulas**, lo que provocaba que durante el tamizado y enjuagado, no se eliminaran la células en su totalidad. Debido a lo anterior cuando el medio presentaba abundante sedimento, se tamizó previa a la malla de 35 micras por una de 300 micras.

Los pesos secos de los rotíferos tratados con ***Nannochloris sp. y Chlorella sp.***, presentaron valores promedio cercanos, lo que puede ser resultado de su **cercania** filogenética.

### 8.2.2.- CARBOHIDRATOS.

Los carbohidratos son la fuente primaria de energía, ya que es a través del sol y la fotosíntesis que los organismos autótrofos capturan energía radiante, convirtiéndola en energía química por medio de la síntesis de glucosa. Como ya se mencionó anteriormente los carbohidratos son a) compuestos estructurales y b) moléculas ricas en energía, que sirven como combustible para la respiración. Sin embargo, tienen un menor aporte energético que los lípidos: un gramo de carbohidratos produce aproximadamente 1/4 del calor que se produce por la oxidación de un gramo de grasa (Lovell, 1988). Es por ello que en los estudios nutricionales no solo de rotíferos sino de otros invertebrados, se da mayor importancia a los lípidos y proteínas.

Los porcentajes de carbohidratos cuantificados a los alimentos *Nannochloris sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Chlorella sp.* y *Spimlina sp.*, son muy similares (24.6, 22.8, 22.5 y 19.4% respectivamente) tanto entre ellos, como con los reportados por Frolov et al. (1991) quienes obtuvieron un 26.8% con *Phaeodactylum tricomutum*, 20.7 con *Monochrysis lutheri* y 20.5 con *Nephrochloris salina*. Whyte y Nagata (1990) observan que del 61 al 80% de los azúcares totales que constituyen a los rotíferos, es glucosa, lo que indica la presencia de glucógeno almacenado, el que varía con la dieta.

### 8.2.3.- PROTEINAS.

Las proteínas son compuestos estructurales y funcionales en los seres vivos. Los requerimientos de las proteínas en las

de peces, **están** influenciados por la especie, el tipo de dieta, tamaño del individuo, así como por factores **tales** como la temperatura del agua, los niveles de oxígeno, entre otros (Pillay, 1990).

Las proteínas son sustancias que se caracterizan por la alta estabilidad de los aminoácidos que las forman. Frolov et al. (1991) observaron que el contenido de proteínas, varía poco entre la fuente de alimento y los rotíferos que la consumen.

Los porcentajes de proteínas cuantificados para los alimentos utilizados en este estudio fueron para *Spirulina sp.*, 70.7; *Naunochloropsis sp.*, 64.9; *Nannochloris sp.*, 59.9 y *Chlorella sp.* 56.5%, siendo estos mayores a los observados por Frolov (op.cit.) (57.2, 48.1 y 50.2 para *Ph. tricornutum*, *M. lutheri* y *N. salina* respectivamente). Rezeq y James (1987) observaron que a una concentración de  $37 \times 10^6$  cel/ml de *Chlorella sp.*, se obtuvo un 23.32% de proteínas. Por su parte los rotíferos cultivados con la microalga tipo "Chlorella", o sea *Nannochloropsis sp.* en el Instituto de pesquerías de Nagasaki (1975 y 1976) **y** en la Estación de Pesquerías Experimentales en Gifu (1975) (Watanabe et al. 1983) presentaron 71, 73.7 y 74.1% de proteínas totales, estos valores son mayores a los cuantificados para la misma microalga en este trabajo.

#### **8.2.4.- LIPIDOS.**

Un abastecimiento adecuado de lípidos por parte de los rotíferos a las larvas de peces, es indispensable para el adecuado crecimiento y desarrollo de las mismas. Los ácidos grasos son de importancia primaria, ya que algunos de ellos son esenciales

para el crecimiento, el desarrollo y el mantenimiento de muchos procesos fisiológicos (Frolov et al. 1991). Algunos estudios han demostrado que los requerimientos de ácidos grasos esenciales difieren considerablemente entre especies (Watanabe et al. 1983).

De los diferentes alimentos utilizados para los rotíferos, ***Chlorella sp.*** presentó el mayor porcentaje de lípidos (20.9%); Frolov et al. (1991) observaron un porcentaje muy similar (20.4%) de grasas en los rotíferos alimentados con ***Monochrysis lutheri***.

***Nanochloropsis sp.*** y ***Nannochloris sp.***, presentaron porcentajes más bajos de lípidos (15.7 y 15.5 % respectivamente), Frolov (op.cit.) encontró porcentajes similares (13.6%) para ***Nephrochloris salina*** y (8.7%) para ***Ph. triconmtum***. Watanabe et al., (1983) cuantificaron porcentajes totales de ácidos grasos para ***Nannochloropsis sp.*** (3.7, 4.2 y 3.8%), considerablemente menores a los obtenidos en este trabajo para el mismo alimento. Whyte y Nagata (1990) refieren porcentajes de lípidos similares a los observados en nuestras experiencias (***T. pseudonana***, 10.0%; ***I. galbana***, 15.8% y ***T. suecica***, 13.1%), sin embargo, para ***Chlorella saccharophila*** el porcentaje de lípidos encontrado por Whyte y Nagata (op. cit.) (9.8%) es considerablemente menor al obtenido en nuestras experiencias para ***Chlorella sp.*** (20.9%).

Rezeq y James (1987) observaron que el porcentaje de lípidos totales, así como de la fracción w3 de los ácidos grasos poliinsaturados PUFA (por su abreviatura en inglés), varía en relación a la concentración de ***Chlorella sp.*** en que se cultiva a los rotíferos. El máximo porcentaje de lípidos totales (36.98%)

y de la fracción w3 (22.85%), obtenido por éstos, se presenta en la ración  $37.5 \times 10^6$  cel/ml, que es 1.76 veces mayor que el obtenido en nuestros resultados.

La variación diaria de los componentes bioquímicos de los rotíferos es un factor importante a considerar en la elección del alimento adecuado para el cultivo de estos microinvertebrados. Los alimentos vivos *Nannochloropsis sp.*, *Nannochloris sp.* y *Chlorella sp.* mantuvieron un comportamiento estable, tanto en las proporciones de los componentes como en su conjunto, es decir que los compuestos bioquímicos siguieron la misma tendencia. En tanto que la microalga deshidratada *Spirulina sp.* presentó variación en ambos. Esta variación debe de estar relacionada con los cambios en la composición bioquímica de las microalgas. En el caso del alimento inerte pudo deberse a la menor ó mayor cantidad de *Spírulína sp.* que fué arrastrada durante el tamizado, la resuspensión y la toma de las muestras para las determinaciones bioquímicas.

#### **8.2.5.- VALOR ENERGETICO.**

El valor energético se define como el contenido de energía de una sustancia, determinado por la completa oxidación del compuesto en dióxido de carbono, agua, gases y como producto principal calor (Lovell, 1988). El valor energetico puede resumirse a la energía que aportan los lípidos, proteínas y carbohidratos, siendo importante este orden ya que los lípidos por unidad de peso (gramo) aportan el mayor contenido energetico, seguido por las proteínas y los carbohidratos.

El orden descendiente de los valores **energeticos** que

obtuvimos para los alimentos probados, coincide con el orden descendente obtenido para los lípidos totales. Esto hace evidente la importancia de los lípidos antes mencionada, por lo tanto la microalga ***Chlorella sp.*** que presentó el mayor porcentaje de lípidos presenta también el más alto valor energético.

Con base a las determinaciones bioquímicas y teniendo en consideración la importancia de los lípidos, las proteínas y los carbohidratos totales, como elementos que son transferidos a los rotíferos por el alimento que consumen y que a su vez son importantes (especialmente los lípidos) para el adecuado crecimiento y desarrollo de las larvas de peces; el mejor alimento de acuerdo a nuestras condiciones de trabajo fué ***Chlorella sp.*** con una mayor cantidad de lípidos, con un alto valor energético y con contenidos medios de proteínas y carbohidratos. En segundo término se encontró el alimento ***Nannochloropsis sp.*** con una cantidad de lípidos y un valor energético muy similar al obtenido con ***Nannochloris sp.***, los cuales son ligeramente menores. En tanto que ***Nannochloris sp.*** presentó el mayor contenido de carbohidratos y una cantidad media de proteínas. Finalmente queda ***Spimlina sp.*** deshidratada con los más bajos valores de lípidos y de valor energético, sin embargo con una elevada cantidad de proteínas y una buena cantidad de carbohidratos.

Ahora bien, debe tenerse en cuenta las facilidades de manejo de los cultivos de ***Nannochloropsis sp.*** y ***Nannochloris sp.***, en los cuales se alcanzan altas densidades en cortos períodos de tiempo (a las temperaturas a las que se trabajó). En tanto que en el cultivo de ***Chlorella sp.***, la fase exponencial tardó en

alcanzarse hasta veinte días y aún a pesar de mantener los cultivos con aereación vigorosa, tendió a aglutinarse y pegarse en las paredes y fondo de los recipientes de cultivo.

El alimento deshidratado *Spirulina sp.* no tuvo una adecuada calidad nutricional, sin embargo es un alimento barato, fácilmente accesible en el mercado, cuyo uso no requiere de mano de obra especializada ni de instalaciones especiales.

### 8.3.- CONFIABILIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS:

Los bioensayos en los cuáles se buscó la ración más adecuada para cada alimento, no fueron simultáneos, lo cuál en cierta medida podría suponer una fuente de variación. Sin embargo, se cuidó que las condiciones de la luz, la temperatura, la calidad del agua, la aereación y la salinidad fueran constantes, ajustándolas la temperatura a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y la salinidad a 36 ‰, en caso de ser necesario.

La confiabilidad de los valores de producción y fecundidad quedó demostrada al no encontrar variación estadísticamente significativa entre los tratamientos de cada ración en los diferentes bioensayos efectuados. Así mismo, la repetibilidad de los experimentos se demostró cuando se realizó el bioensayo en el cuál se probaron de manera simultánea las mejores raciones de cada tipo de alimento y se comparó lo obtenido en este experimento contra las experiencias anteriores (para cada uno de los alimentos, en los cuáles se obtuvo la ración óptima), no encontrando diferencias significativas.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los valores de los peso seco, las concentraciones de los

carbohidratos, las proteínas y los lípidos totales de los tratamientos de los diferentes alimentos probados.

La evaluación de la población por medio de el número de rotíferos considerando huevos (producción) y fecundidad (relación huevos/hembra), resultan adecuados cuando se usan en conjunto, ya que puede suceder la existencia de un número elevado de rotíferos, los cuales carecen casi por completo de huevos, teniendo consecuentemente un valor bajo de fecundidad, lo cuál indica un pobre estado de salud de la cepa de rotíferos. Pudiendo también presentarse el caso contrario, en el cuál existen valores altos de fecundidad producto de una relación de pocos huevos con un número menor de hembras, tal como ocurrió en los rotíferos tratados con el alimento formulado **Topal**. Sin embargo, al observar el número de rotíferos considerando huevos para este mismo ejemplo, se ve que éste es insignificante. Con base a lo anterior, se desprende la importancia de usar conjuntamente los parámetros número de rotíferos considerando huevos (producción) y fecundidad, los cuales se complementan y nos dan una idea más clara del estado de salud del cultivo de rotíferos.

## 9. - CONCLUSIONES

1.- Con base en los parámetros número de rotíferos por mililitro de cultivo (producción) y fecundidad, el mejor alimento fué **Nannochloris sp.** en una ración de  $25 \times 10^6$  cel/ml, seguido por **Nannochloropsis sp.** con  $25 \times 10^6$  cel/ml, **Chlorella sp.** con  $35 \times 10^6$  y por último **Spirulina sp.** deshidratada a 0.9 g/1.5 l de medio de cultivo.

2.- El alimento formulado Topal fué encontrado como un alimento deficiente, para las condiciones en las que se realizó este estudio.

3.- Con base en las determinaciones bioquímicas (carbohidratos, proteínas, lípidos y valor energetico) el mejor alimento fué **Chlorella sp.** seguido por **Nannochloropsis sp.** y **Nannochloris sp.** y finalmente **Spirulina sp.** deshidratada.

4.- Conjuntando los criterios: número de rotíferos considerando huevos (rch), fecundidad y las determinaciones bioquímicas, así como la facilidad de manejo de los cultivos de microalgas, se concluye que **Nannochloropsis sp.** y **Nannochloris sp.** en una densidad de  $25 \times 10^6$  cel/ml son alimentos adecuados para el cultivo del rotífero **Brachionus plicatilis.**

## 10.- R E C O M E N D A C I O N E S

1) Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, se recomienda mantener la cepa y realizar los cultivos de rotíferos con las microalgas ***Nannochloropsis sp.*** y ***Nannochloris sp.***

2) Realizar a estas microalgas los análisis de las fracciones lípidicas (especialmente la fracción linolenica) y la composición de **aminoácidos**, para de esta manera tener la seguridad de que es recomendable su utilización.

3) Conocer los requerimientos nutricionales de las larvas de peces, los cuales difieren de especie a especie. Ya que si tenemos en cuenta que la composición bioquímica de los rotíferos, depende de la composición bioquímica del alimento con que se les mantiene, esta puede manipularse tratando de optimizar su calidad nutricional en beneficio de las larvas de peces.

4) Continuar con la experimentación del cultivo de rotíferos en volúmenes mayores, a fin de conocer las condiciones necesarias para su realización, por ejemplo: volumen de recambio, periodicidad del recambio, mantenimiento del cultivo con alimentos baratos y posteriormente con un cultivo secundario que incremente su calidad nutricional.

## 11.- BIBLIOGRAFIA

- Ben-Amotz, A. y R. Fishler. 1982. Induction of sexual reproduction and resting egg production in *Brachionus plicatilis* by a diet of salt-growth *Rannochloris oculata*. Mar. Biol. 67:289-294.
- Brusca, R. C. y G. J. Brusca. 1990. Invertebrates. Sinauer Asoc. Inc. 922pp.
- Chiang, Y-M y J-I. Young. 1978. The effect of diferent foods on the growth of a brackish water rotifer *Brachionus plicatilis*. China Fish. Month. No. 303
- Contreras, F. 1985. Las lagunas costeras mexicanas. Centro de Ecodesarrollo, Sría de Pesca. 17-18pp.
- Contreras-Olguin, M., Ortíz-Galindo, J.L. y R. Martínez-Pecero. 1989. Morfometria meristica y pigmentación de los primeros estadios de vida de *Paralichthys woolmani* (Jordan y Williams) Pisces. 4a Reunión de la Sociedad Mexicana de Planctologia A.C. La Paz, B.C.S. 27 - 29 de abril de 1989.
- De la Cruz, A. y D. Millares. 1974. Método de cultivo masivo de *Brachionus plicatilis* (Rotifera) a escala experimental. Ciencias Ser. 8, Inv. Mar. 11:60-62.
- Dreywood, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18:499.
- Esteves, A. y A. Planas. 1987. Mass production of sea bass fingerlings (*Dicentrarchus labrax*). Inf. Inst. Invest. Pesq. Barc. No. 139,12pp
- Frolov, A. V., S.L. Pankov, K.N. Geradze, S.A. Pankova y L.V. Spectorova. 1991. Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture 97 2/3:181-282.
- Fukusho, K. 1989. Biology and mass production of the rotifer *Brachionus plicatilis* (2). Int. J. Aq. Fish. Tech. Vol.1:292-299
- Fukusho, K. 1991. Red sea bream culture in Japan. pp 73-87 en McVey, P.C. (editor) CRC Handbook of Mariculture. Vol. II Finfish aquaculture. CRC Press.
- Fulks, W. y L. Main. 1992. Rotifer and microalgae culture systems. Argent Press. 364pp.

Gatesoupe, F.J. y P. Luquet. 1981. Practical diet for mass culture of the rotifer **Brachionus plicatilis**: application to larval rearing of sea bass **Dicentrarchus labrax**. Aquaculture, 22:149-163.

Gatesoupe, F.J. y J. H. Robin. 1981. Commercial single-cell proteins either as sole source or in formulated diets for intensive and continuous production of rotifers (**Brachionus plicatilis**). Aquaculture 25:1-15

Gatesoupe, F.J., T. Arakawa y T. Watanabe. 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder **Paralichthys olivaceus**. Aquaculture 83:39-44.

Girin, M. y B. Devauchelle. 1974. Production du rotifere **Brachionus plicatilis** (O. F. Müller) en élevage mixte avec le copepode **Tisbe furcata** (Baird). Actes de Colloque Sur l'Aquaculture No. 1:87-99 CNEEXO ed.

González-Acosta, B. y R. Ramírez-Sevilla. 1987. Criterios para la selección de un medio de cultivo para microalgas marinas. 2o Congreso de la Asociación Mexicana de Acuicultura AMAC'87, La Paz, B.C.S. 24-28 de nov. 1987.

Hepher, B. y Y. Pruginin. 1989. Cultivo de peces comerciales. Basado en las experiencias de las granjas piscícolas en Israel. Ed. Limusa 196pp

Hirata, H., S. Yamasaki y M. Ogawa. 1983. Continuous culture of the rotifer **Brachionus plicatilis** fed recycled algal diets. Hydrobiologia 104:71-75.

Hirayama, K. y S. Ogawa. 1972. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. I.- Feeding of rotifer. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38(11):1207-1214.

Hirayama, K., K. Watanabe y T. Kusano. 1973. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. III Influence of phytoplankton density on population growth. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 39:1123-1127.

Hirayama, K., K. Takagi y H. Kimura. 1979. Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on marine population growth of the rotifer **Brachionus plicatilis**. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 45:11-16.

Hirayama, K. y H. Funamoto. 1983. Supplementary effect of several nutrients on nutritive deficiency of baker's yeast for population growth of the rotifer **Brachionus plicatilis**. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 49:505-510.

Hirayama, K. 1985. Biological aspect of the rotifer *Brachionus plicatilis* as a food organism for mass culture of seedling. Colloque Franco-Japonais d'Océanographie. Marseille 16-21 sept 85. 41-50.

Hung, M. 1989. Ensayo de cultivo de una cepa de rotífero *Brachionus plicatilis* aislada en Venezuela. Rev. Latinoamericana de Acuicultura. 40:83-112.

Ito, T. 1955. Studies on the "mizukawari" in eel-culture ponds. I.- The feeding activity of *Brachionus plicatilis* on phytoplankton (as a cause of "mizukawari"). Report of Faculty of Fisheries 2 (3):162-167.

Ito, T. 1957. Studies of "mizukawari" in eel-culture ponds. VI.- The relation between the growth of *Brachionus plicatilis* and the quantity of phytoplankton. Report of Faculty of Fisheries 2(3):502-516.

Ito, T. 1960. On the culture mixohalino rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller in sea water. Rep. Fac. of Fish. Pref. Univ. Mie. Vol 3(3)708-740.

James, C. M., P. Dias y A. E. Salam. 1987. The use of marine yeast (*Candida sp.*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in combination with *Chlorella sp.* for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia 147(1):263-268.

Juárez-Palacios, R. R. 1987. La acuicultura en México, importancia social y económica. pp.219-232, en Sría. de Pesca (editor) Desarrollo Pesquero Mexicano 1986-1987 (III)

Liao, I-CH. 1991. Milkfish culture in Taiwan. pp 91-115. en McVey, P.C. (editor) CRC Handbook of Mariculture. Vol. II Finfish aquaculture. CRC Press.

Lovell, T. 1988. Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold. 260pp

Lowry, O.H., N. H. Rosebrought, F. A. Lewis y R.I. Randal. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biochem. Chem. 193:265-275.

Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. Hydrobiologia 147:245-255.

Lubzens, E. G., G. Koldny, B. Perry, N. Galai, R. Sheishinski y Y. Wax. 1990. Factors affecting survival of rotifers (*Brachionus plicatilis* O. F. Müller) at 4°C. Aquaculture 91:23-47 pp.

Martinez-Pecero, R., E. Matus-Nivon, R. Ramírez-Sevilla, D.E.Hernández-Ceballos y M. Contreras-Olguin. 1990. Huevo, larva y juvenil del peluquero **Chaetodipterus zonatus** (Girard) (Pisces: Ehippidae). Rev. Biol. Trop., 38(1):71-78.

Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, J.L. Ortiz-Galindo, R. Martinez-Pecero y B. González-Acosta. 1989a. El huevo y la larva de la sardina crinuda del Pacífico **Ophistonema libertate** (Günther). Rev. Biol. Trop., 37(2):115-125.

Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, R. Martínez-Pecero y J.L. Ortiz-Galindo. 1989b. Descripción de la larva y juvenil del mojarrón **Calamus brachisomus** (Lockington) (Pisces:Sparidae). Inv. Mar. CICIMAR Vol. 4(2)141-150.

Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, R. Martínez-Pecero y J.L. Ortiz-Galindo. 1990. Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico Mexicano, con base en su biología temprana. en La acuicultura en México: de los conceptos a la producción. (eds. De la Lanza-Espino, G. y J.L. Arredondo Figueroa) Instituto de Biología UNAM. 67-74pp.

Mitchell, S.A. 1986. Experiences with outdoor semi-continuous mass culture of **Brachionus calyciflorus** Pallas (Rotifera). Aquaculture 51:289-297.

National Research Council. 1983. Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes. National Academy Press. 102pp

Okauchi, M., T. Ossiroy, S. Kitamura, A. Tsuijido y K. Fukusho. 1980. Number of **Brachionus plicatilis**, consumed daily by a larva and juvenile og porgy, **Acanthopagrus schlegelii**. Bull. Nat. Res. Inst. Aqu. 1:39-45.

Ortiz-Galindo, J.L., E. Matus-Nivón, R. Ramírez-Sevilla y B. González-Acosta. 1990. Embrión, larva y prejuvenil del sol mexicano **Achirus mazatlanus** (Pisces:Soleidae). Rev. Biol. Trop. 38(2A)195-204.

Ortiz-Galindo, J.L. 1991. Ontogenia inicial de la mojarra rayada **Eugerres axillaris** Günther, 1864. Tesis de maestria, CICIMAR - IPN.

Ostrowski, A.C. y S. Divakaran. 1990. Survival and Bioconversion of n-3 fatty acids during early development of dolphin **Coryphaena hippurus** larvae fed oil-enriched rotifers. Aquaculture 89(3/4):273-285.

Ounais-Guschermmann, N. 1989. Determination of larval mass rearing standards in the sea bream **Sparus auratus**. Aix-Marseille-2-Univ. 184pp

Person-Le Ruyet, J. 1975. Techniques d'elevage en masse d'un rotifere (*Brachionus plicatilis* Muller) et d'un crustacé branchiopode (*Artemia salina* L.). 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium. 1:331-343.

Person-Le Ruyet, F. Baudin-Laurencin, N. Devauchelle, R. Metallier, J. Robin y J. Guillaume. 1991. Culture of turbot *Scophthalmus maximus*. 21-41 en McVey, J.P. (editor) Handbook of Mariculture. Vol II Finfish Aquaculture. CRC Press.

Pillay, T.V.R. 1990. Aquaculture principles and practices. Fishing News Books. 575pp.

Pionetii, J.M., S. Carriere y J. Quessada. 1986. Energy metabolism of marine fishes during the period of yolk absorption and early stages of feeding. Nutrition and Genetics in the marine environment: Biochemical approaches. Vol. 12 No. 4:252-260.

Polo, A., M. Yúfera y E. Pascual. 1992. Feeding and growth of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae in relation to the size of the rotifer strain used as food. Aquaculture 103:45-54.

Ramírez-Sevilla, R. 1988. Biología del desarrollo temprana de *Cynoscion parvipinnis* Ayres (Pisces: Sciaenidae) y sus implicaciones acuaculturales. Tesis de Maestria, Ciencias Biológicas IPN 75pp.

Ramirez-Sevilla, R., R. A. Rueda-Jasso, J.L. Ortiz-Galindo y B. González-Acosta. 1991. Metodología para el cultivo experimental del rotífero *Brachionus plicatilis*. Inv. Marinas CICIMAR Vol 6 (2) (en prensa).

Rezeq, T.A. y C. M. James. 1987. Production and nutritional quality of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed marine *Chlorella sp.* at different cell densities. Hydrobiologia 147:257-261.

Rico-Martínez, R. y S. I. Dodson. 1992. Culture of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. Aquaculture 105: 191-199.

Salvatore, G. y A. Mazzola. 1981. Mass culture of *Brachionus plicatilis* with one integrated system of *Tetraselmis suecica* y *Saccharomyces cerevisiae*. J. World Maricul. Soc. 12(2)61-62.

Scott, P. A. y S. M. Baynes. 1978. Efecto de la dieta algal y la temperatura en la composición bioquímica del rotífero *Brachionus plicatilis*. Aquaculture 14:247-260.

Siegel, S. y N. J. Castellan. 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. 2nd ed. McGraw-Hill Co. 399pp.

Snell, T. W., C. J. Bieberich y R. Fuerst. 1983. The effects of green and blue-green alga diets on the reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture 31:21-30.

Snell, T. y K. Carrillo. 1984. Body size variation among strain of rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 37:359-367.

Spectoreva, L. U., O. I. Goronhova, L. P. Nosova O. N. Albiskaya. 1982. High-density culture of marine microalgae promising items for mariculture. I.- Mineral feeding regime and installation for culturing *Dunaliella tertiolecta*. *Aquaculture* 26: 286-302.

Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1982. *Biometry*. 2nd ed. W. H. Freeman Co. 689pp.

Starweather, L.P. y P.E. Kellar. 1983. Utilization of the cyanobacteria by *Brachionus calyciflorus*: *Anabaena flos-aquae* (NRC-44-1) as a sole or complementary food source. *Hydrobiologia* 104:373-377.

Theilacker, G. H. y F. McMaster. 1971. Mass cultivation of the rotifer *Brachionus plicatilis* and its evaluation as a food for larval anchovies. *Mar. Biol.* 10:183-188.

Theilacker, G.H. y A. S. Kimball. 1984. Comparative quality of rotifers and copepods as foods for larval fishes. *Cal. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep.* 25:80-85.

Teshima, S., A. Kanazawa y M. Sakamoto. 1981. Attempts to culture the rotifers with microencapsulated diets. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47(12):1575-1578.

Torrentera-Franco, L. 1987. La disponibilidad de cepas, un problema fundamental de los cultivos intensivos. 20 Congreso de la Asociación Mexicana de Acuicultura AMAC'87, La Paz, B.C.S. 24-28 de nov. 1987.

Tookwinas, S. 1990. Larviculture of sea bass (*Lates calcarifer*) and grouper (*Epinephelus malabaricus*) in Thailand. *Advances in Tropical Aquaculture: Workshop held in Tahiti, French Polynesia. Feb 20- 4 March 1989.* pp 645- 659

Vasil'eva, G.I. y G. L. Okuneva. 1985. Experiments on rearing the rotifer *Brachionus plicatilis* as food for young fish. *Manuscrito* 20 pp.

Walker, K. F. 1981. A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Müller 1786. *Hydrobiologia* 81:159-167.

Watanabe, T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73b(1):3-15.

Watanabe, T., C. Kitajima y S. Fujita. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34:115-143

Whyte, J.N.C. y W.D. Nagata. 1990. Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, fed monospecific diet of yeast or phytoplankton. *Aquaculture* 89:263-272.

Yúfera, M. y E. Pascual. 1985. effects of algal food concentration and ingestion rate of *Brachionus plicatilis* in mass culture. *Hydrobiologia* 122:181-187.

Clase y Orden	Género y Especie	Autor y año
Chlorophyceae Hormogonales	Schizothrix sp.	Snell et al, 1983a
Prasinophyceae Pavlovaales	Monochrysis lutheri	Person-Le Ruyet, 1975
Chlorophyceae Eustigmatophyceae	Nannochloropsis oculata	Theilacker y McMaster, 1971 Hirayama y Ogawa, 1972 Hirayama et al, 1979, 1983 Hirayama y Funamoto, 1983 Ben-Amotz y Fishler, 1982
Chlorophyceae Eustigmatophyceae	Nannochloropsis gaditana	Yufera y Pascual, 1985
Chlorophyceae Biddulphiales	Chaetoceros gracilis	Hung, 1989
	Cyclotella sp.	Hirayama et al, 1979
	Phaeodactylum tricornutum	Ben-Amotz y Fishler, 1982
Chlorophyceae Volvocales	Chlamydomonas sp.	Ito, 1960
	Chlamydomonas reinhardtii	Chiang y Young, 1978
	Dunaliella tertiolecta	Theilacker y McMaster, 1971 Girin y Devauchelle, 1974
Chlorococcales	Chlorella sp.	Rezeq y James, 1987 Hung, 1989 Chiang y Young, 1978 Mitchell, 1986 Snell et al, 1983a
	Chlorella stigmatophora	Lubzens, 1987
	Chlorella marina	Ben-Amotz y Fishler, 1982
	Chlorella salina	Ben-Amotz y Fishler, 1982
	Chlorella ovalis	Ben-Amotz y Fishler, 1982
	Chlorella vulgaris	Rico-Martinez y Dodson, 1992
	Scenedesmus acuminatus	Vasil'eva y Okuneva (ms)
	Nannochloris sp.	Theilacker y McMaster, 1971 De la Cruz y Millares, 1974
Chlorophyceae Pyramimonadales	Tetraselmis chuii	Hung, 1989
	Tetraselmis suecica	Person-Le Ruyet, 1975

Cuadro 1.- Especies de microalgas que se han utilizado como alimento en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*

Tipo alimento	Género v Especie	Autor v año
Levaduras	Saccharomyces cerevisiae	Lubzens et al., 1990
	Candida sp.	James et al., 1987 Hirata et al., 1983
Bacterias	Anabaena flos-aquae	Starweather y Kellar, 1983
	Thiocapsa roseopersicina	Sakamoto y Hirayama, 1983
Alimentos inertes	Spirulina sp. liofilizada	Person-Le Ruyet, 1975
	Scenedesmus sp. liofilizada	Person-Le Ruyet, 1975
	Plantymonas suecica seca, congelada	Gatesoupe y Robin, 1981
	Topal alimento formulado	Lubzens, et al., 1990
	Microencapsulados	Teshima et al., 1981

Cuadro 2.- Dietas alternativas que se han usado como alimento en el cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*.

Familia	Género y Especie	País	Autor y año
Chanidae	Chanos chanos	Taiwan	Liao, 1991
Centropomidae	Lates calcarifer	Tailandia	Tookwinas, 1990
Sparidae	Sparus auratus	Francia	Ounais-Guscherman, 1989
		Espana	Polo et al., 1992
Sparidae	Pagrus major	Japon	Fukusho et al., 1984
			Fukusho, 1991
Sparidae	Acanthopagrus schlegeli	Japon	Okauchi et al., 1980
Percichthyidae	Dicentrarchus labrax	Francia	Gatesoupe & Luquet, 1981
		Espana	Esteves & Planas, 1987
Serranidae	E. malabaricus	Tailandia	Tookwinas, 1990
Coryphaenidae	Cotyphaena hippurus	E U A	Ostrowski y Divakaran, 1990
Pleuronectidae	Scophthalmus maximus	Francia	Person-Le Ruyet et al., 1991
Bothidae	Paralichthys olivaceus	Francia	Gatesoupe et al., 1989

Cuadro 3.- Publicaciones internacionales en las cuales se describe la utilización del rotífero *Brachionus plicatilis*.

Familia	Género y Especie	Autor y año
Clupeidae	Ophisthonema libertate	Matus-Nivon et al.,1 989b
Gerreidae	Eugeres axillaris	Ortiz-Galindo, 1991
Gerreidae	Gerres cinereus	Matus-Nivon et al.,1 990
Serranidae	P. maculatofasciatus	Matus-Nivon et al.,1 990
Haemulidae	Anisotremus interruptus	Matus-Nivon et al.,1 990
Sparidae	Calamus brachysomus	Matus-Nivon et al.,1 989a
Scianidae	Cynoscion parvipinnis	Ramirez-Sevila et al.,1 988
Ephippididae	Chaetodipterus zonatus	Martinez-Pecero et al.,1 990
Bothidae	Paralichthys woolmani	Contreras-Olguin et al.,1 989
Soleidae	Achirus mazatlanus	Ortiz-Galindo et al.,1 990

Cuadro 4.- Trabajos realizados por el grupo CICIMAR IPN en los que se utilizó al rotífero *Brachionus plicatilis*.

Reactivo	Concentración
Na NO <sub>3</sub>	1100 μM
Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	100 μM
Mn Cl <sub>2</sub>	10 μM
Zn Cl <sub>2</sub>	25 μM
Fe so <sub>4</sub>	20 μM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	5 μM
co Cl	150 nM
Cl <sub>1</sub> Cl <sub>2</sub>	150 nM
Na <sub>2</sub> EDTA	80.6 μM
Cianocobalamina	1 μg/l
Biotina	1 μg/l
Tiamina	100 μg/l

Cuadro 5.- Medio Marino I, tomado de González-  
 Acosta y Ramirez-Sevilla 1987.

Alimento	Raciones
<i>Nannochloropsis sp.</i>	10, 15, 20, 25, 30 y 35 x 10E6 cel/ml
<i>Nannochloris sp.</i>	15, 20, 25, 30 y 35 x 10E6 cel/ml
<i>Chlorella sp.</i>	20, 25, 30, 35 y 4-0 x 10E6 cel/ml
<i>Spirulina sp.</i>	0.225, 0.430, 0.675, 0.900 y 1.125 g/1.5 l.
Topa1	0.52, 0.77, 1.03, 1.30, 1.50 g/1.5 l.

Cuadro 6.- Alimentos y raciones utilizadas en la realización de los diferentes bioensayos.

Obtención de la ración óptima para cada alimento.	
Objetivo	Prueba estadística
Detectar diferencias significativas entre rch y fec. para los duplicados de c/u de las raciones.	Prueba de Wilcoxon
Detectar diferencias significativas entre rch y fec. entre las raciones para cada alimento.	Prueba de Friedman de dos vías
Definir las raciones con respuestas similares y detectar la ración en la cual rch y fec. son máximos, para cada alimento.	Comparaciones múltiples entre grupos.
Definición de la calidad nutricional de los rotíferos cultivados con la mejor ración de cada alimento.	
Objetivo	Prueba estadística
Detectar diferencias significativas entre rch y fec. para los triplicados de los diferentes alimentos.	Prueba de Cochran
Establecer diferencias significativas entre las conc. de peso seco, carboh., proteínas y lípidos.	Análisis de variancia de dos vías con repeticiones.
Valorar los mayores aportes de los componentes bioquímicos.	Comparaciones planeadas entre las medias.

Cuadro 7.- Pruebas estadísticas que se aplicaron a los datos obtenidos en los diferentes bioensayos. En todas las pruebas se utilizó un 95% de probabilidad.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	F
Alimento vivo vs inerte	3.46511071 E-05	6.9 *
Alimento vivo	2.64421923E-05	5.2 *
Chlorella vs. Nannochloris, Nannochloropsis	1.41621E-08	2.8 ns
Nannochloris vs. Nannochloropsis	2.643283E-05	5.2 *
Entre tratamientos	6.109329E-05	4.0 *

Cuadro 8.- Tabla ANDEVA. Comparaciones entre los pesos secos obtenidos para cada tratamiento. Nivel de significancia 95%.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	F
Alimento vivo vs. inerte	0.33927	4.56 **
Alimento vivo	7.0437E-04	9.48 ***
Chlorella vs. Nannochloris, Nannochloropsis	7.4637E-06	0.11 ns
Nannochloris vs Nannochloropsis	6.969134E-05	9.38 ***
Entre tratamientos	0.00104364	4.68 **

Cuadro 9.- Tabla ANDEVA. Comparaciones entre los contenidos de los carbohidratos totales para cada tratamiento. Nivel de significancia 95 %.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	F	
Alimento vivo vs. inerte	0.19097774	25.5	***
Alimento vivo	0.049801346	6.69	**
Chlorella vs. Nannochloris, Nannochloropsis	0.0445425	5.9	**
Nannochloris vs Nannochloropsis	0.0052658	0.71	ns
Entre tratamientos	0.240797	10.73	***

Cuadro 10.- Tabla ANDEVA. Comparaciones entre los contenidos de las proteínas totales para cada tratamiento. Nivel de significancia 95%.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	F	
Alimento vivo vs. inerte	2.63273135E-06	38.5	***
Alimento vivo	3.1131 E-08	0.544	ns
Chlorella vs. Nannochloris, Nannochloropsis	1.4750E-08	0.215	ns
Nannochloris vs. Nannochloropsis	1.638E-08	0.239	ns
Entre tratamientos	2.663862E-06	13.1	***

Cuadro 11.- Tabla ANDEVA. Comparaciones entre los contenidos de los lípidos totales para cada tratamiento. Nivel de significancia 95%.

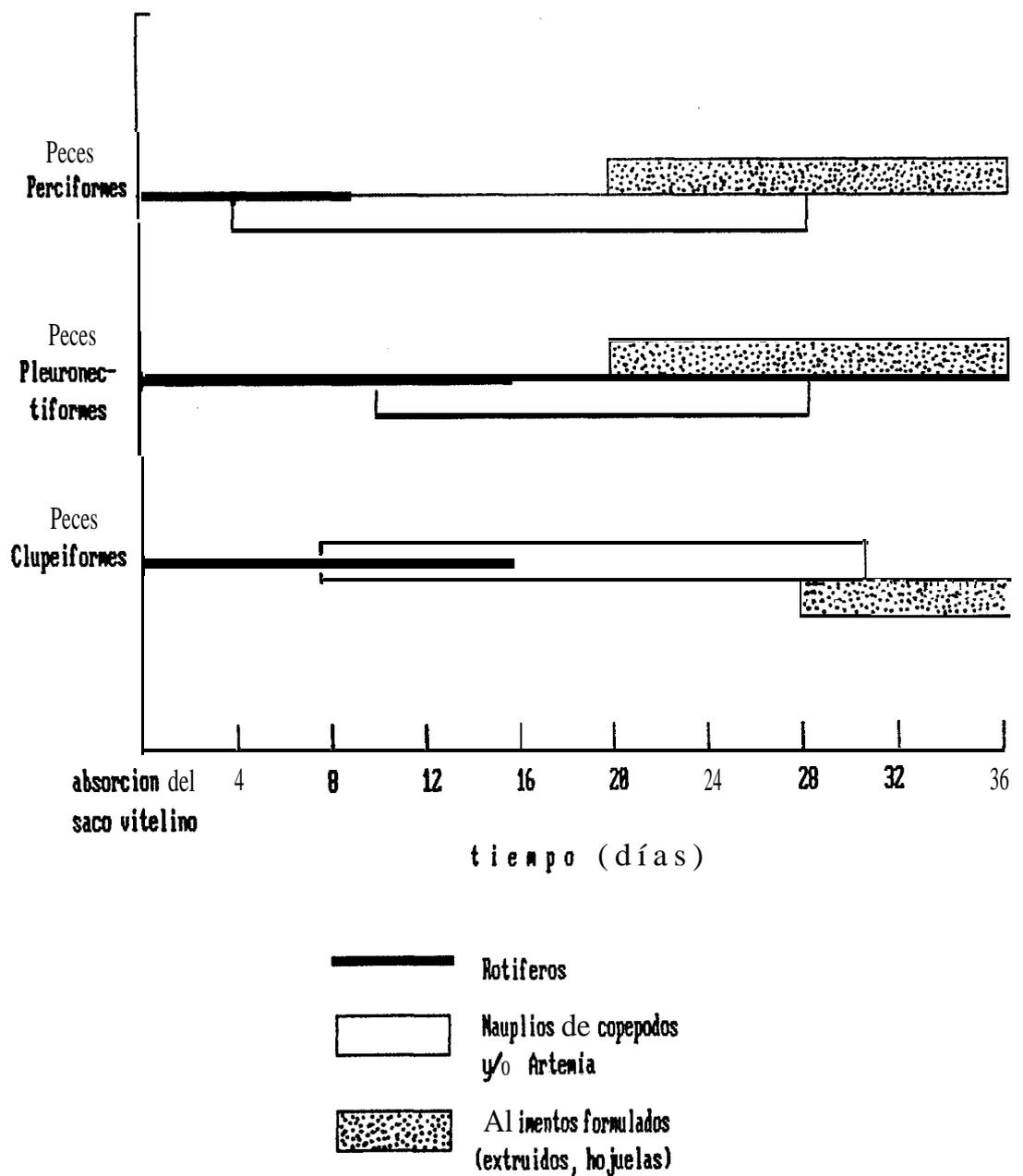


FIGURA 1

Diferentes clases de alimentos que son utilizados en los períodos larvario y en la fase prejuvenil para tre tipos de peces (tomado de Hirayama 1985 y modificado por Rueda-Jasso).

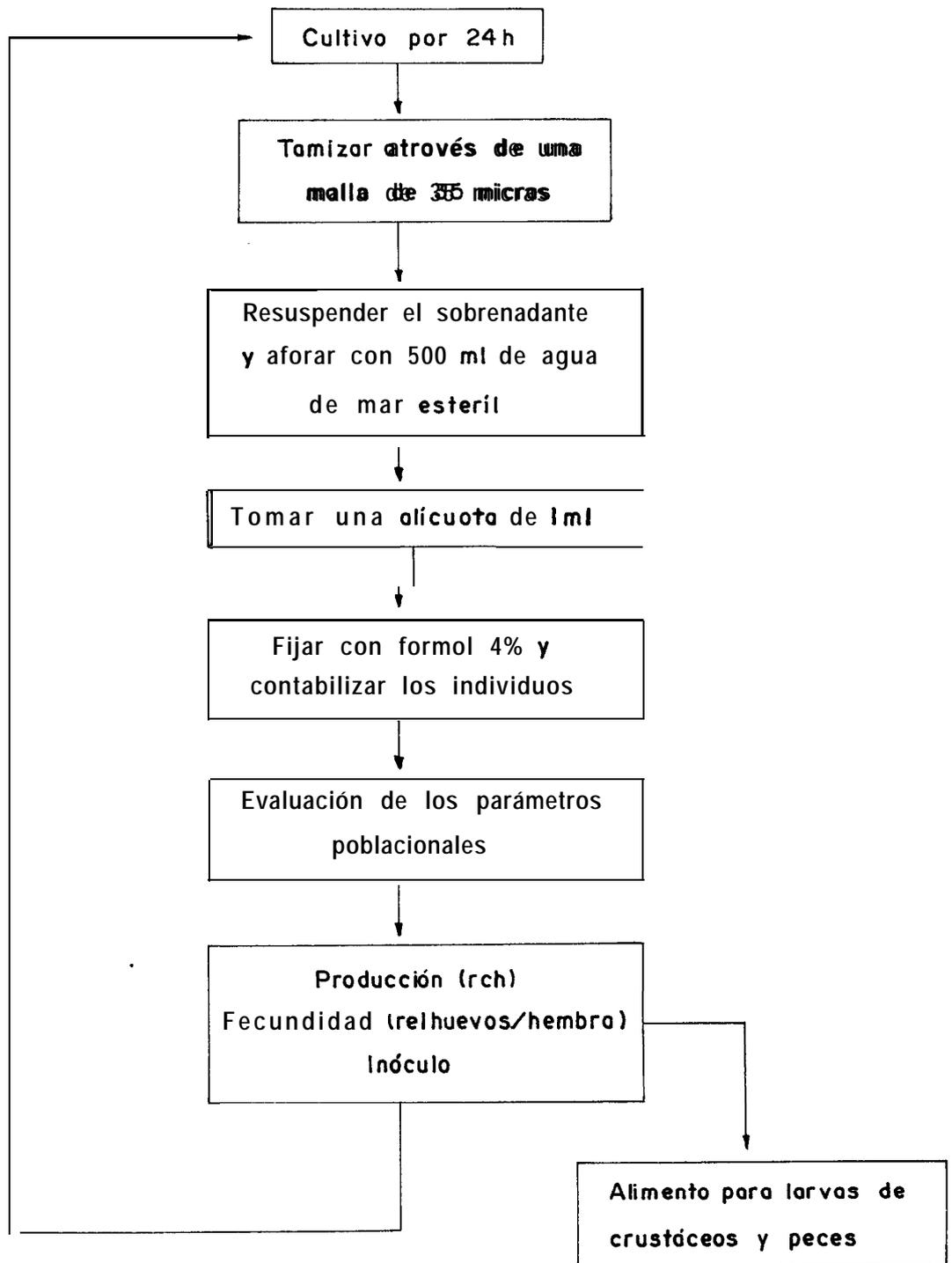


Figura 2 : Diagrama de flujo de la rutina de trabajo en el mantenimiento de la cepo y cultivo de rotíferos, utilizado en el laboratorio de **Biología Experimental CICIMAR-IPN**.

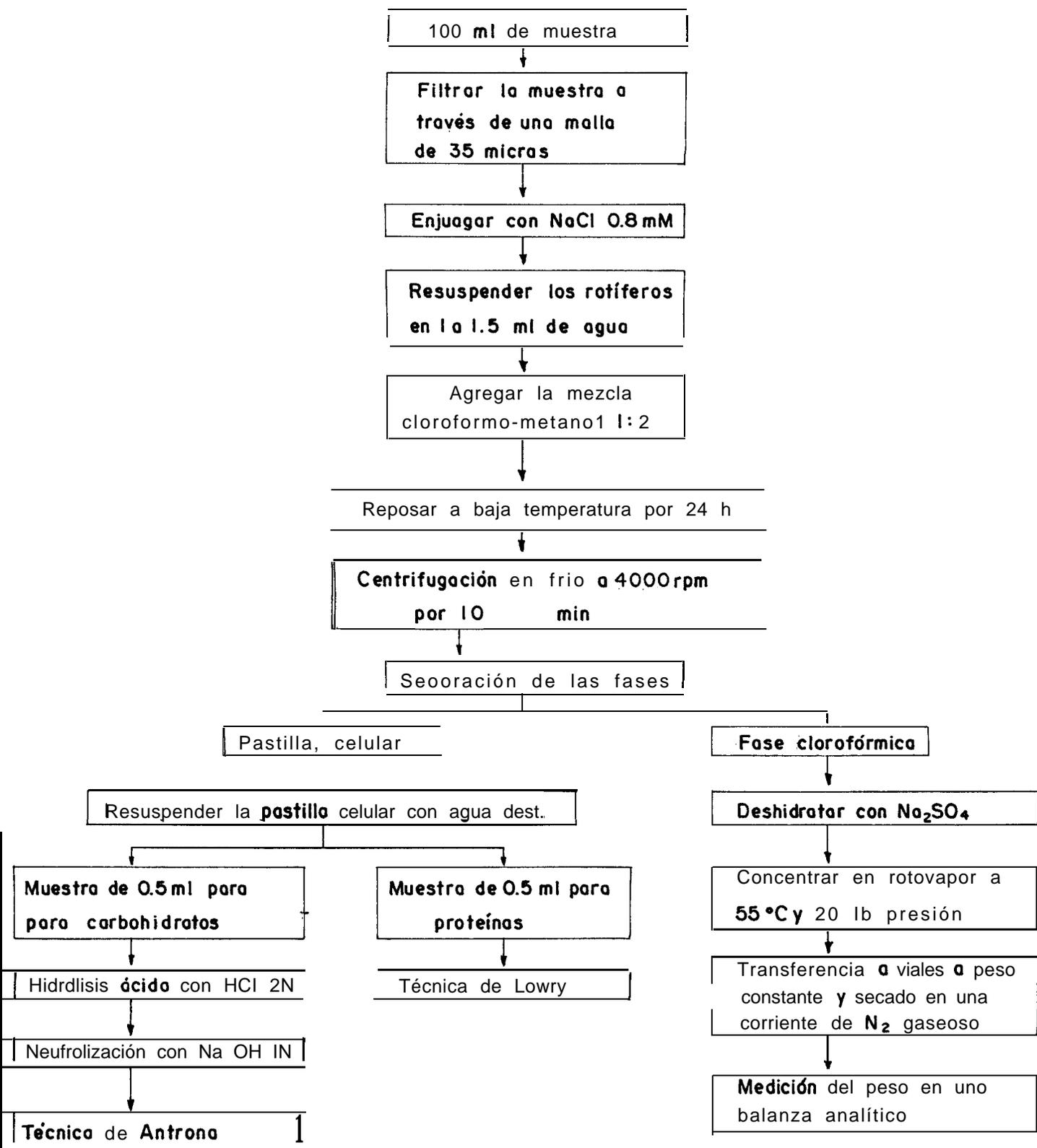
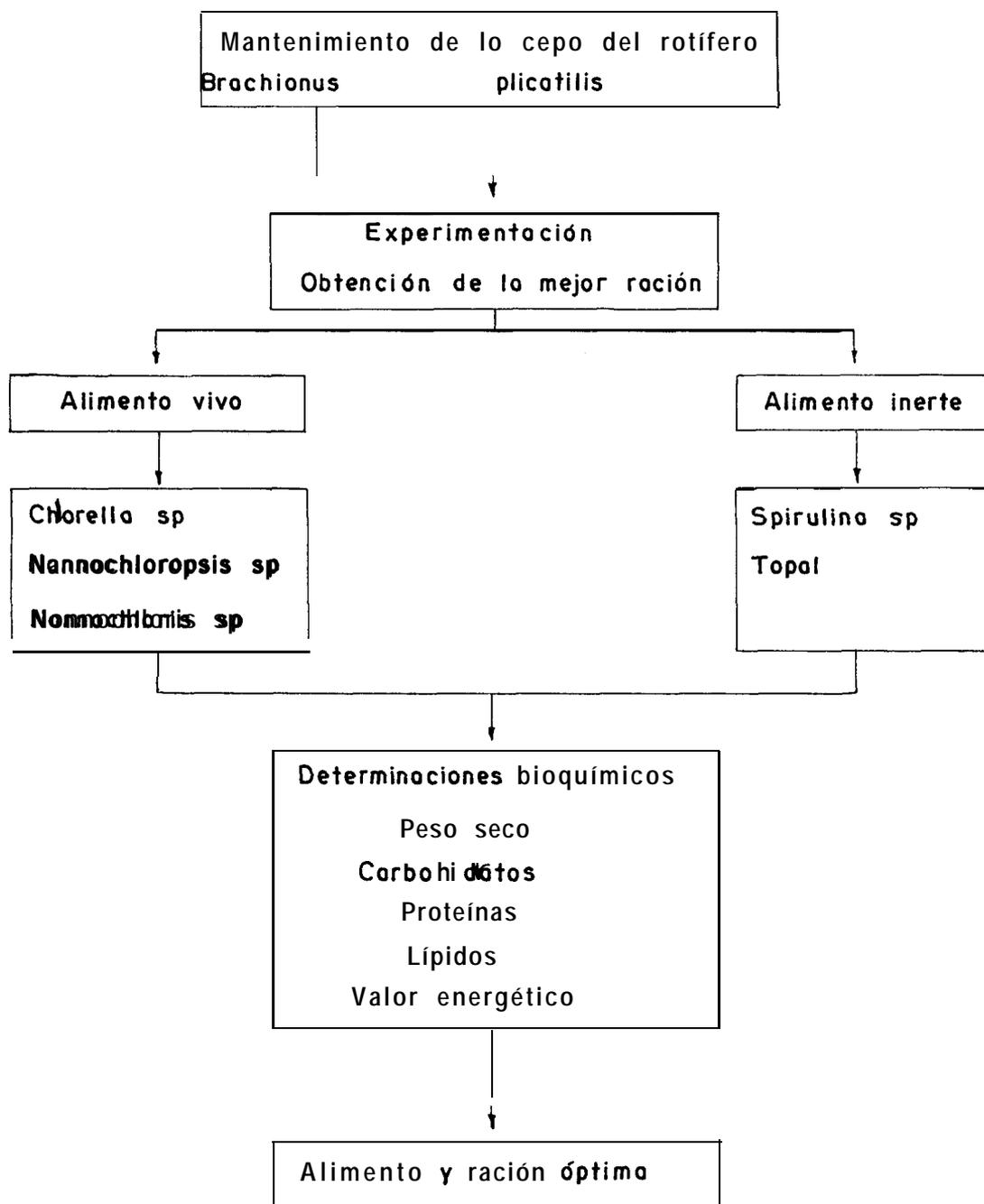


Figura 3.- Diagrama de flujo de las determinaciones bioquímicas.



figuro 4.- Diagrama de flujo del diseño experimental.

# *Alimentos vivos*

Produccion rot/ml

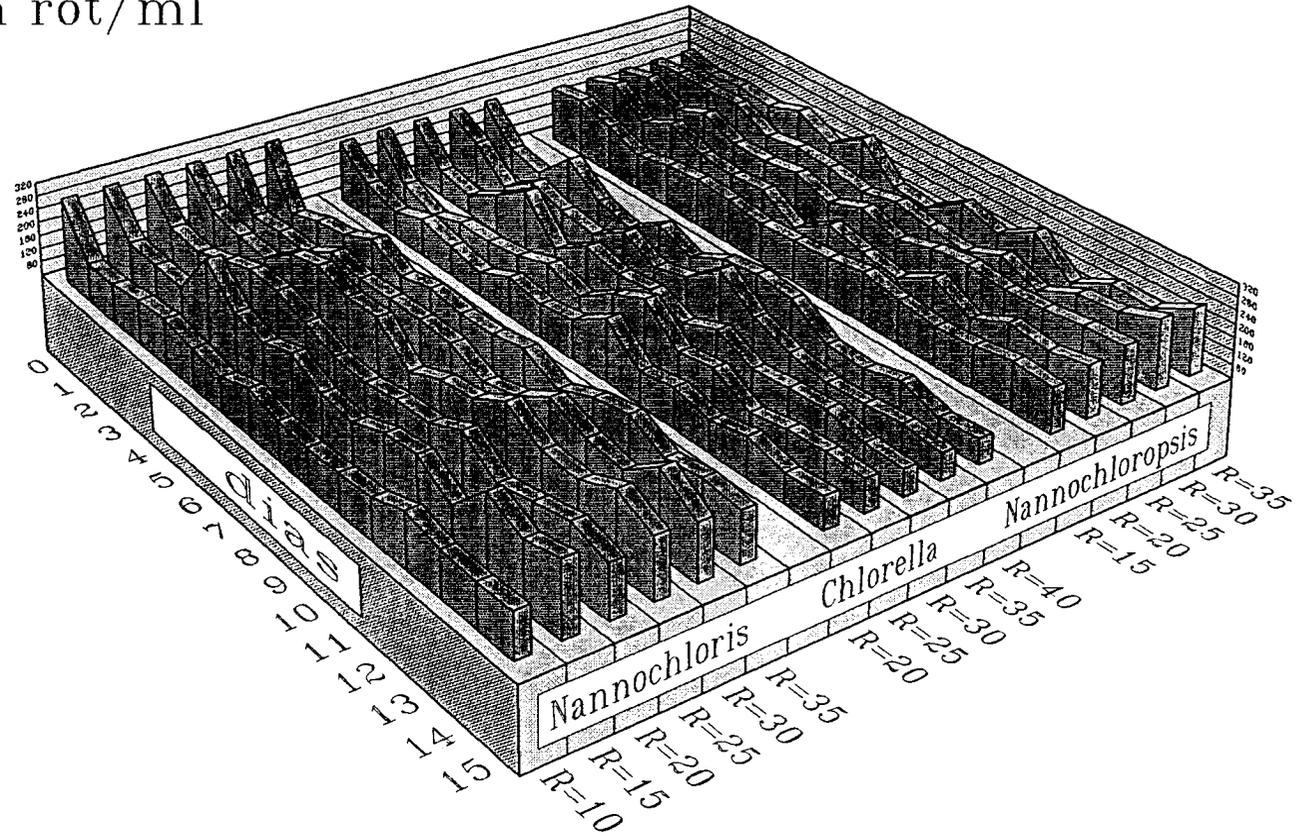


Figura 5.— Producción (rotíferos considerando huevos por ml de cultivo) obtenidos en la experimentación con alimentos vivos.

# *Alimentos inertes*

Produccion rot/ml

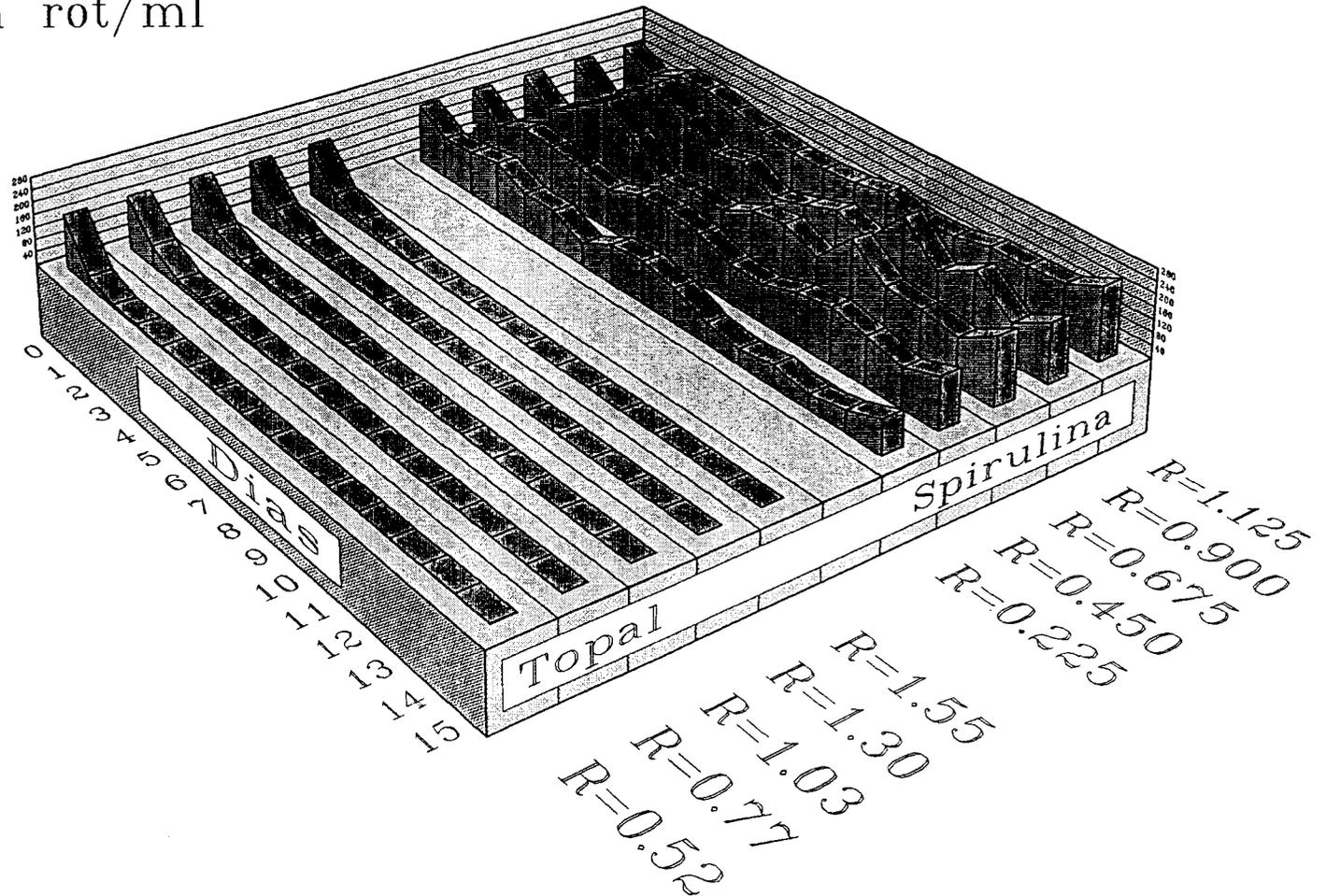


Figura 6.- Producción (rch) obtenidos en la experimentación con alimentos inertes .

# *Alimentos vivos*

Fecundidad

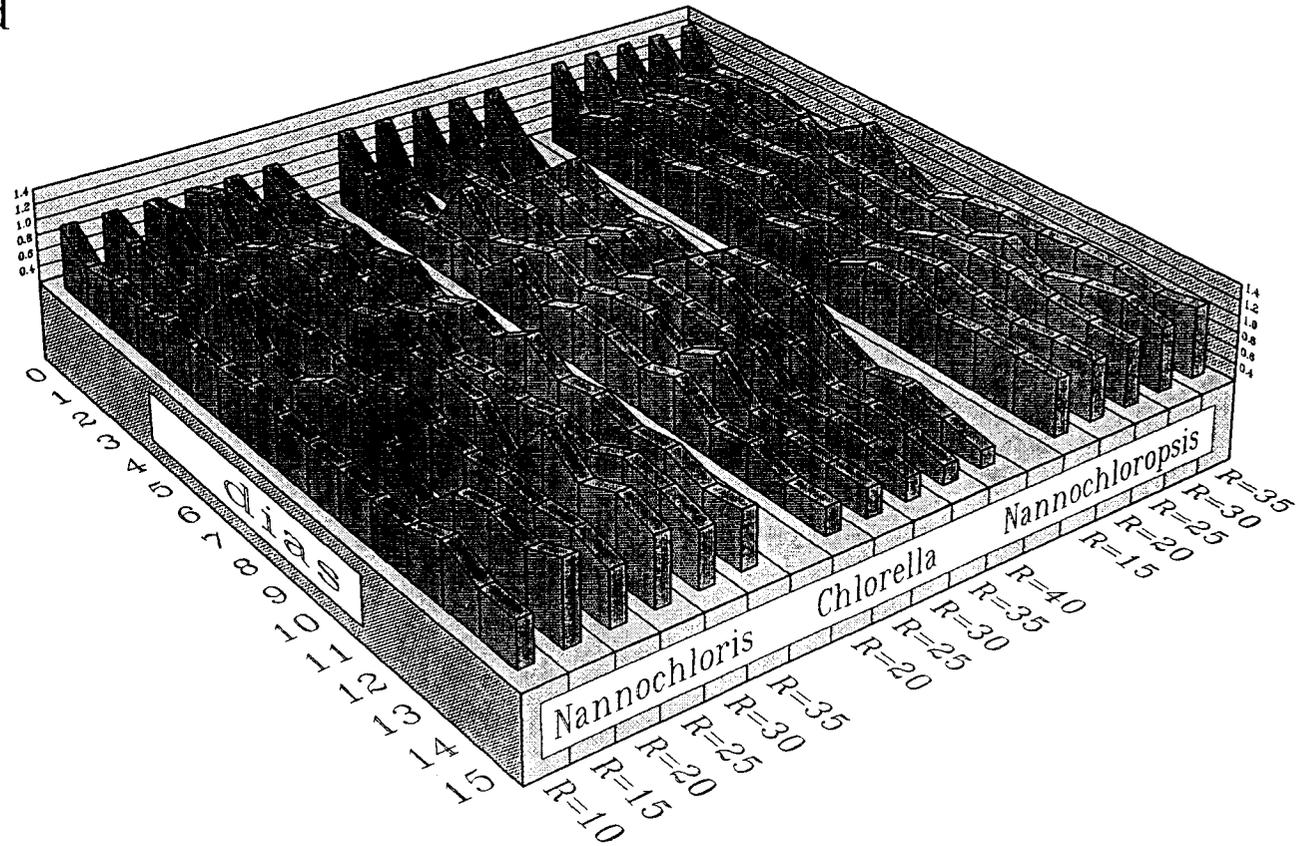


Figura 7.- Fecundidades obtenidas en la experimentacion con alimentos vivos.

# *Alimentos inertes*

Fecundidad

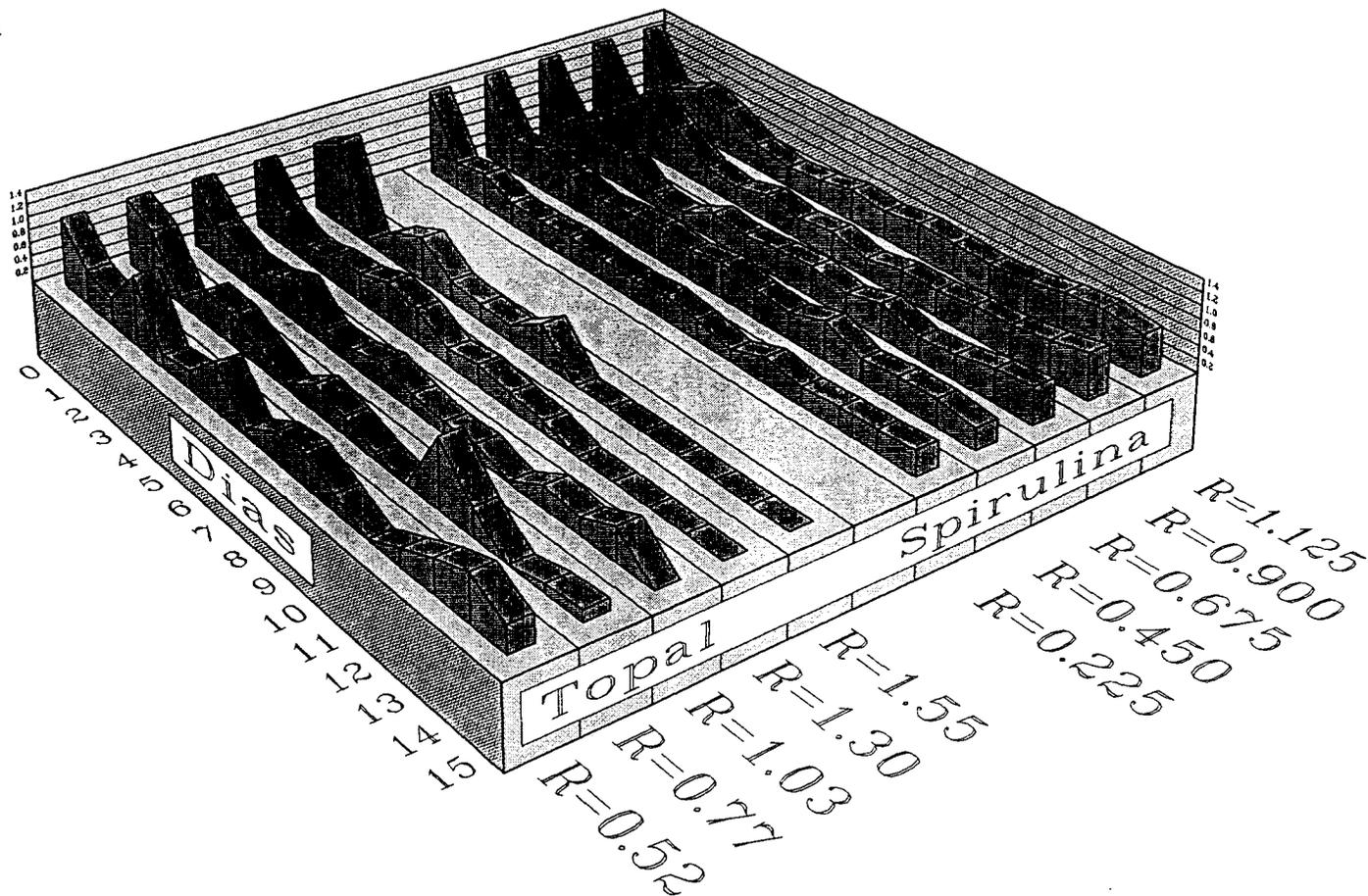


Figura 8.- Fecundidades obtenidas en la experimentación con alimentos inertes.

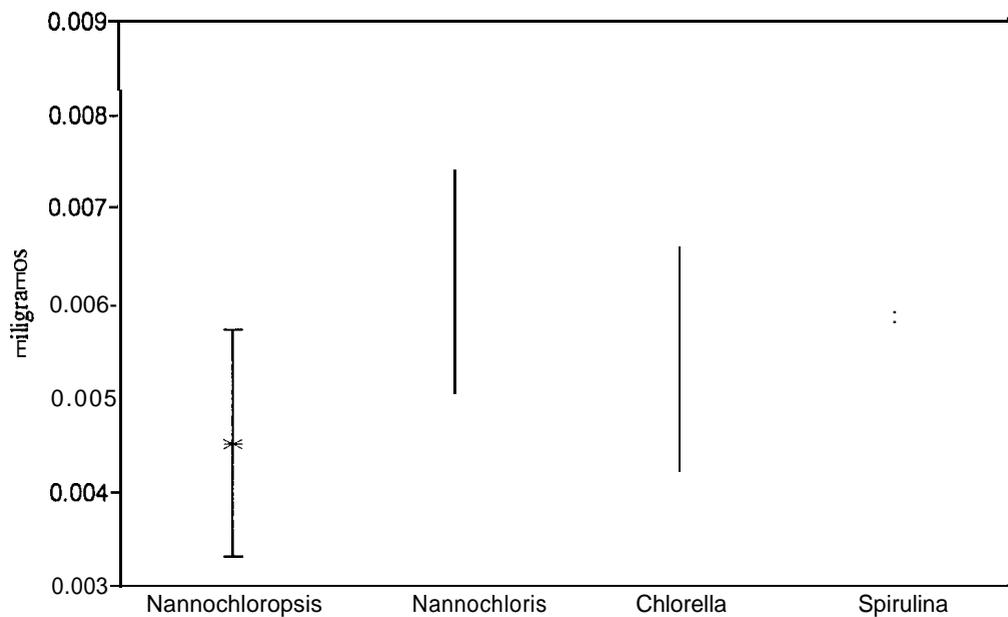


Figura 9.- Medias y desviaciones estándar de los pesos **secos**.

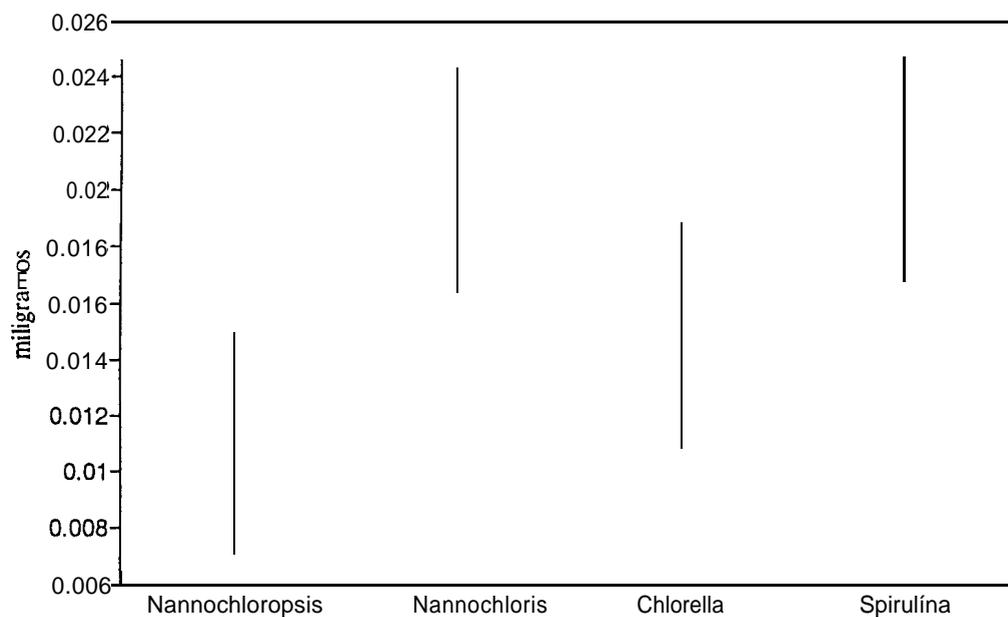


Figura 10.- Medias y desviaciones estándar de los contenidos de los carbohidratos totales.

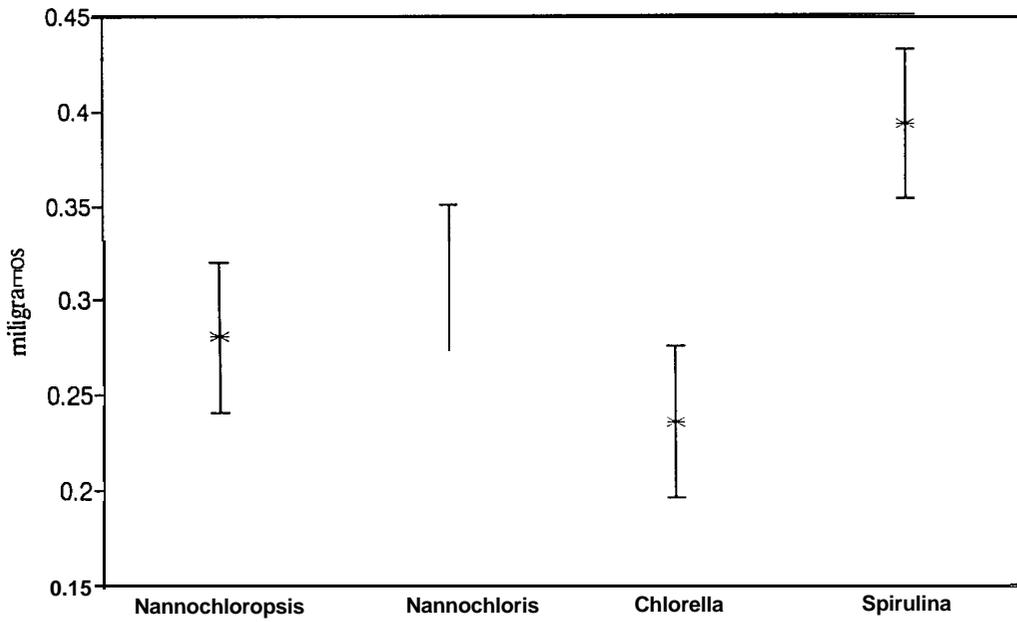


Figura 1 1.- Medias y desviaciones estándar de los contenidos de las proteínas totales.

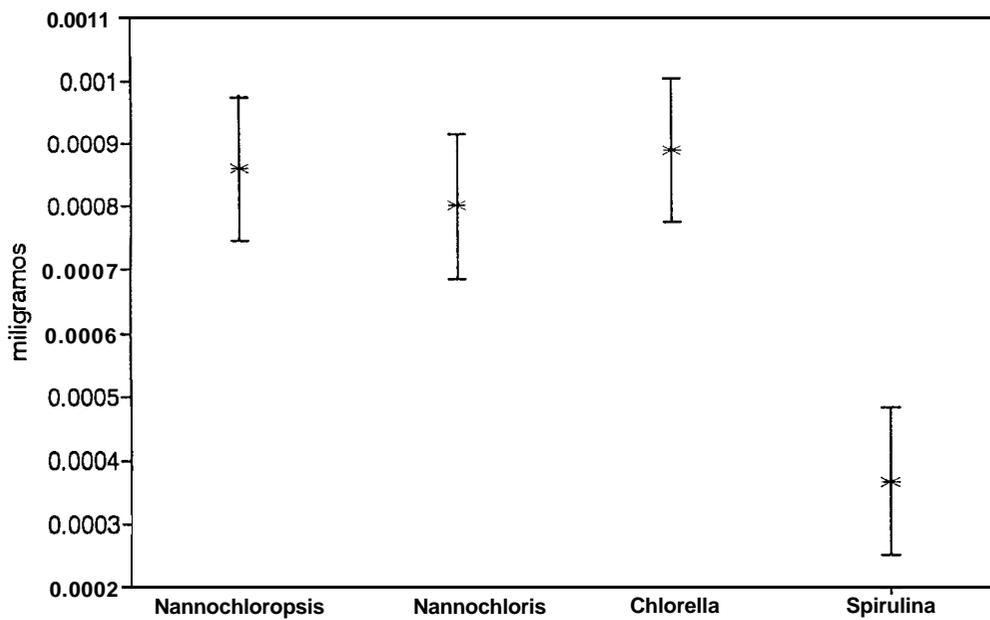
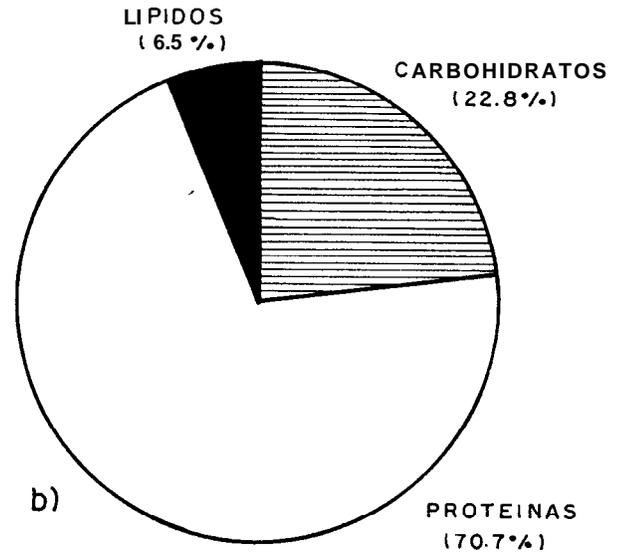
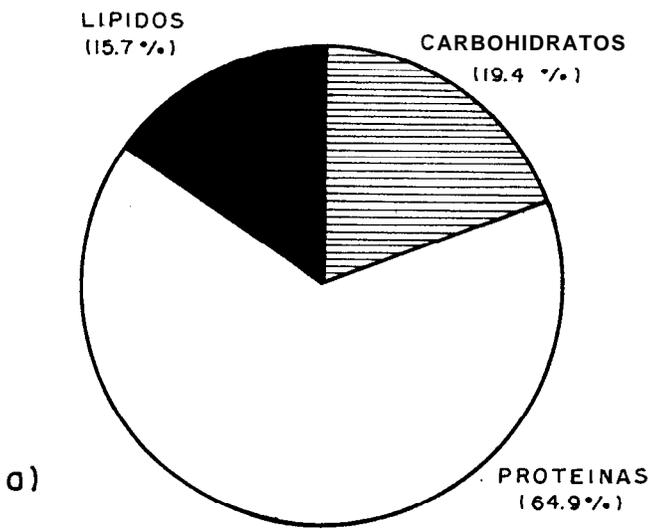


Figura 12 .- Medias y desviaciones estándar de los contenidos de los lípidos totales.

Nannochloropsis sp

Spirulina sp.



Nannochloris sp.

Chlorella sp.

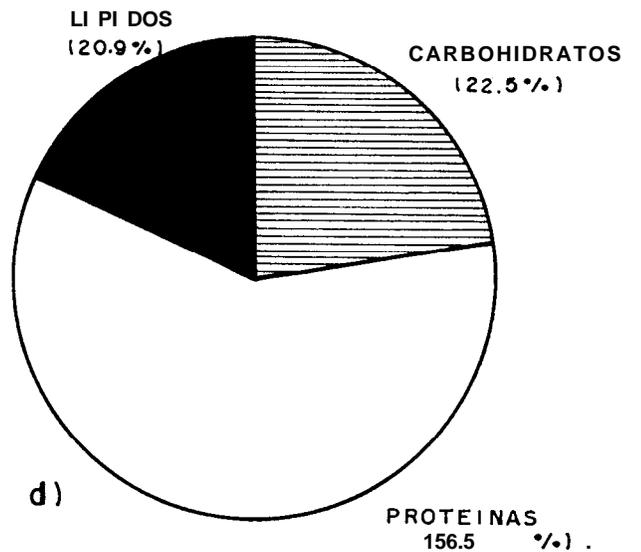
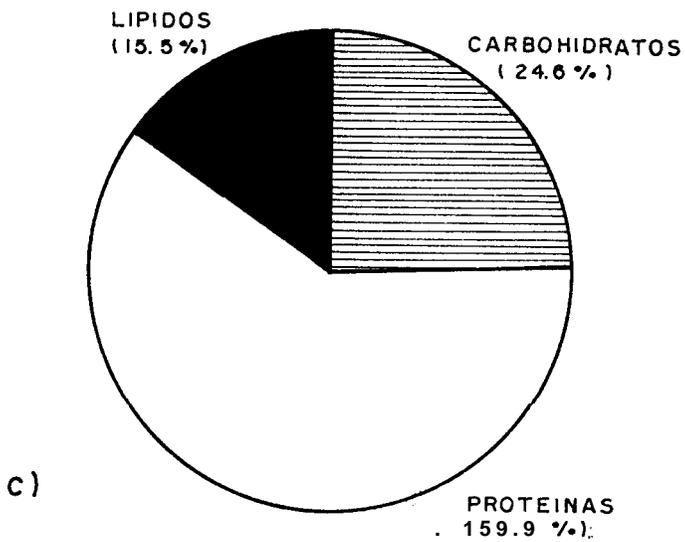


FIGURA 13 : Determinación bioquímica de rotíferos alimentados con: a) Nannochloropsis sp ; b) Spirulina sp. ; c) Nannochloris sp. ; d) Chlorella sp.

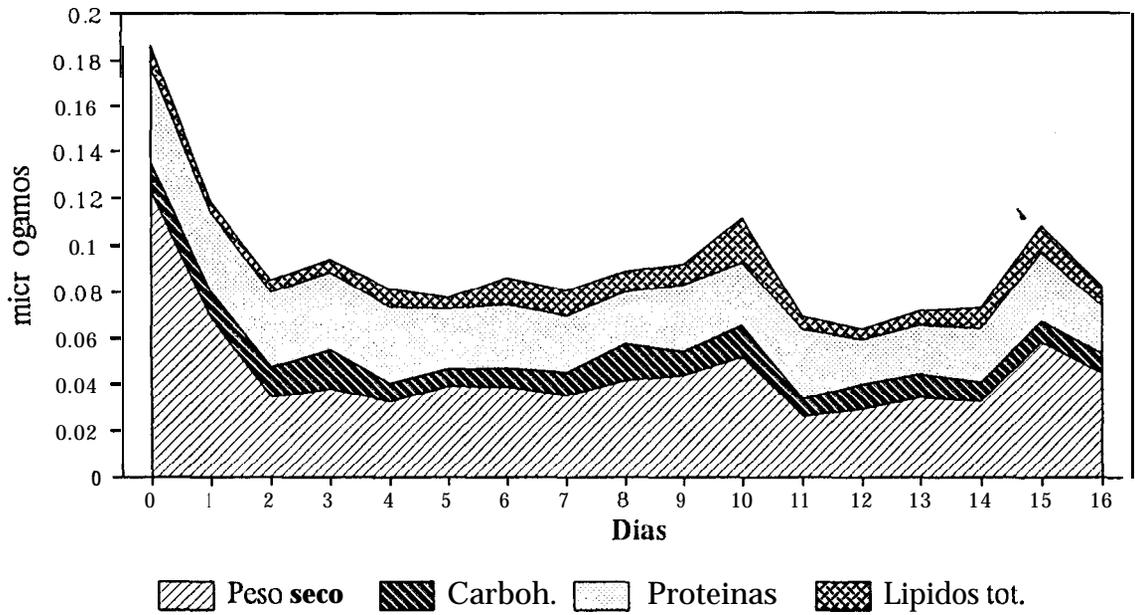


Figura 14.- Variación de los componentes bioquímicos de los rotíferos alimentados con *Nannochloropsis sp.*

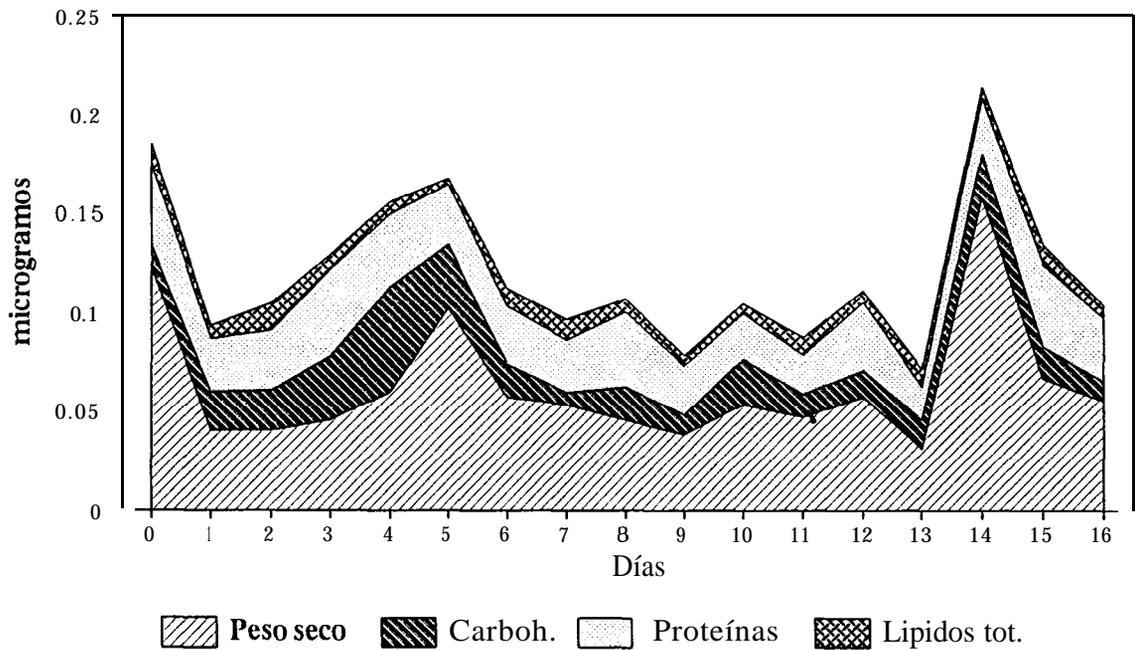


Figura 15.- Variación de los componentes bioquímicos de los rotíferos alimentados con *Nannochloris sp.*

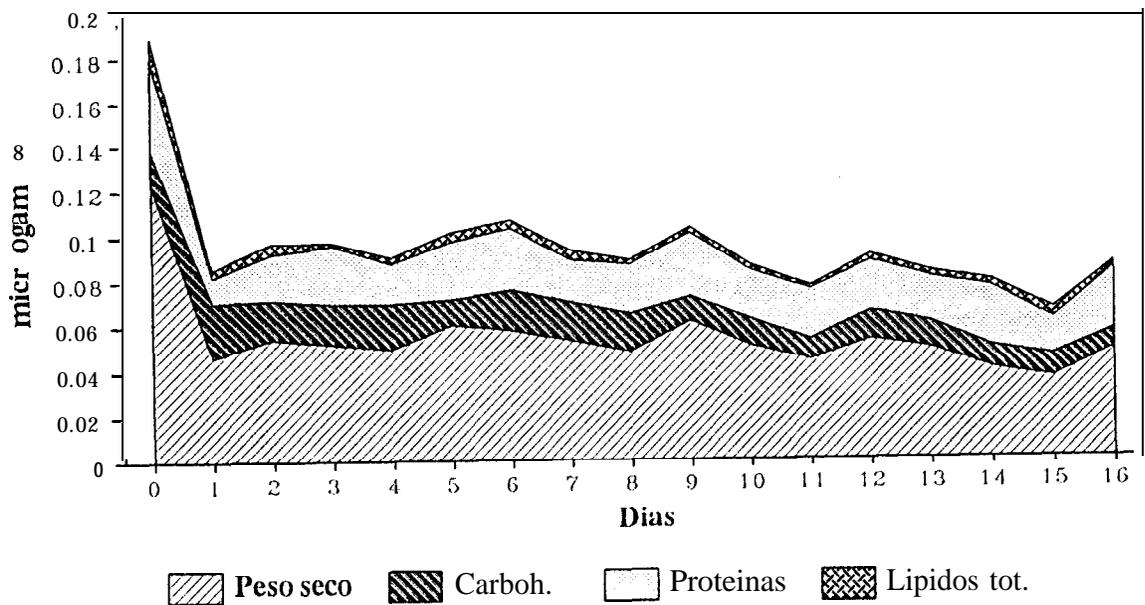


Figura 16.- Variación de los componentes bioquímicos de los rotíferos alimentados con *Chlorella sp.*

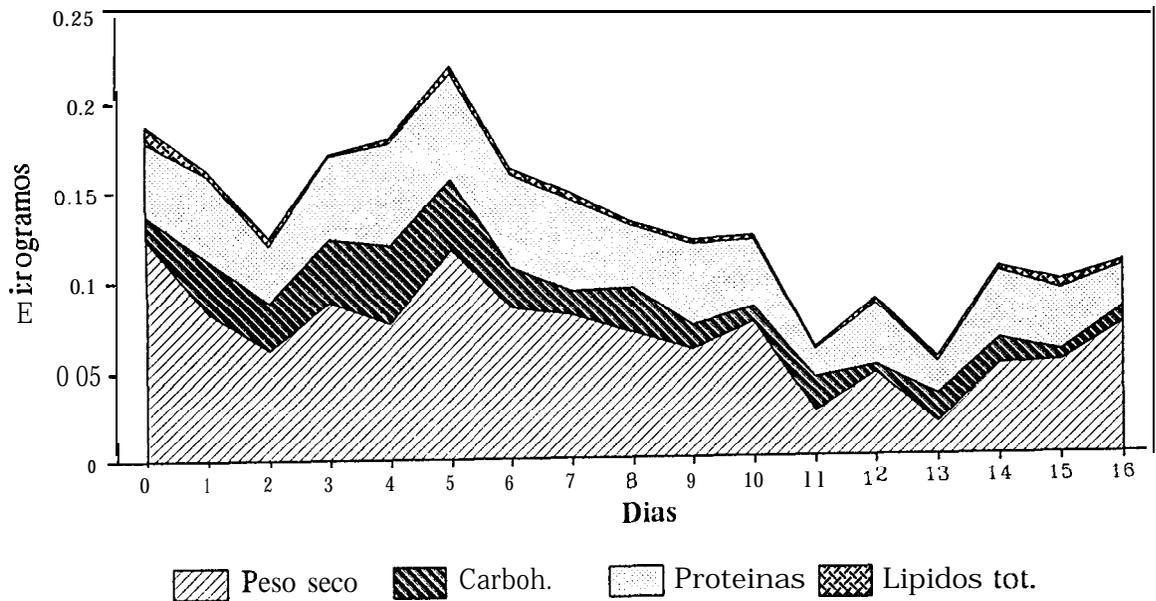


Figura 17 .- Variación de los componentes bioquímicos de los rotíferos alimentados con *Spirulina sp.* deshidratada.