



**Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología**

Unidad Académica Mazatlán

Universidad Nacional Autónoma de México



ADAPTACION DE TÉCNICAS DE CULTIVO INTENSIVO  
DEL ROTÍFERO *Brachionus rotundiformis* A ESCALA EXPERIMENTAL Y PILOTO  
PARA SU USO COMO PARTE DEL ALIMENTO VIVO EN ACUICULTURA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(Biología Marina)

P R E S E N T A ;  
**JUAN LUIS SÁNCHEZ TÉLLEZ**

Director de Tesis: Dr. Luis Sergio Alvarez- Lajonchere Garcia

Comité Tutoral: Dr. Armando Ortega Salas

Dra. Emma Josefina Fajer Avila

M. En C. Roberto Cortes Altamirano

Dr. Singaraju Sri Subrahman Sarma

MAZATLÁN, SINALOA 2008.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DECLARACIÓN

El presente trabajo de tesis es el resultado del autor, excepto en la fase experimental que se llevó a cabo bajo la dirección y supervisión del Dr. Luis Sergio Alvarez Lajonchère. Asimismo, el autor ha dado reconocimiento en el texto a las fuentes de información consultadas.

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos se da consentimiento al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la U.N.A.M. La divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos correspondientes, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.

---

Biol. Juan Luis Sánchez Téllez.

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y director de tesis Dr. Luis Sergio Alvarez Lajonchère por su dirección, apoyo, confianza y amistad, por compartir su gran experiencia y conocimientos sin límites; haciendo posible la realización del presente trabajo.

A todos los miembros del comité de revisión de tesis a la Dr. Armando Ortega Salas y la Dra. Emma Josefina Fajer Avila por sus comentarios y sugerencias, al Dr. Singaraju Sri Subrahman Sarma y el M en C. Roberto Cortes Altamirano por todas sus contribuciones en la realización de este trabajo.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la Unidad Académica Mazatlán, ICMyL, UNAM por abrir sus puertas y apoyar mi ascenso profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado.

Dr. Nick King Skretting MHF, por su apoyo al haber donado el Culture Selco Plus® y Ori-Culture®.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C.) por permitir el uso de sus instalaciones, a todos los que ahí laboran y que de manera directa o indirecta participaron apoyando en la realización de este trabajo. Muy en especial al Laboratorio de genética y reproducción.

A todos los amigos y familiares que me apoyaron y creyeron en mí.



## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la tierra que bien tubo en recibirme así como a su gente; sin su ayuda no hubiese sido posible la realización del presente trabajo y que mejor manera de expresar mi sentir que con el corrido a Mazatlán.

*Foy que el destino  
me trajo hasta esta tierra  
donde el pacífico es algo sin igual  
es necesario que suene la guitarra  
para cantarse un corrido a Mazatlán*

*Yo sé que debo cantar con toda el alma  
para esta gente que es pure corazón  
a ver si llega mi canto a la montaña  
y hasta en el faro se escuché mi canción.*

*Ay que bonito paseo del Centenario  
ay que bonita también su catedral  
aquí hasta un pobre se siente millenario  
aquí la vida se pasa sin llorar.*

*Yo soy fuereño  
nací de aquí muy lejos  
y sin embargo les digo en mi cantar  
que tienen todos ustedes un orgullo  
el gran orgullo de ser de Mazatlán.*

*Esas mujeres que tienen por mujeres  
ante las rosas las pueden comparar  
porque el aroma que tienen los claveles  
lo tienen ellas y tienen algo más*

*Y de sus hombre pos' que podría decirles  
que son amigos y nobles en verdad  
y sin que chviden sus típicas arañas  
que lindo es todo lo que hay en Mazatlán.*

*Ay que bonito paseo del Centenario  
ay que bonita también su catedral  
aquí hasta un pobre se siente millenario  
aquí la vida se pasa sin llorar.*

*Yo soy fuereño  
nací de aquí muy lejos  
y sin embargo les digo en mi cantar  
que tienen todos ustedes un orgullo  
el gran orgullo de ser de Mazatlán.*

JOSE ALFREDO JIMÉNEZ.

## INDICE

DECLARACIÓN .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
DEDICATORIA .....	III
LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN .....	XIV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 GENERALIDADES .....	1
1.2 ALIMENTO VIVO .....	2
2. ANTECEDENTES .....	7
2.1. GENERALIDADES .....	7
2.2 CONDICIONES AMBIENTALES DE CULTIVO.....	12
2.3 CONDICIONES BIOLÓGICAS DE CULTIVO .....	14
3. JUSTIFICACION.....	23
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS .....	25
5.1 Objetivo General .....	25
5.2 Objetivos Particulares.....	25
6. MATERIALES Y METODOS .....	26
6.1 Instalaciones CIAD unidad Mazatlán .....	26
6.1.1 Laboratorio de genética y reproducción .....	26
6.1.2 Área piloto.....	30
6.1.3 Fuentes de Agua.....	33
6.1.4 Fuentes de Aire .....	35
6.1.5 Sanidad (prevención de infecciones).....	36
6.1.6 Taller y Herramientas.....	38
6.10 EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN 1.2 m <sup>3</sup> .....	56
6.11 Registro de Datos.....	56
6.2 Cadena de Producción de Microalgas .....	39
6.3 ORGANIGRAMA DEL USO DE LAS INSTALACIONES .....	42
6.4 Elaboración de Filtros.....	42
6.5 Instalaciones de Oxígeno.....	42
6.6 Cadena de Producción de Rotíferos.....	44
6.7 Conteo de Rotíferos .....	46
6.8 Parámetros Físico-químicos y Biológicos .....	48
6.9 Diseño Experimental de los trabajos a pequeña escala.....	49
6.9.1 Diseño.....	49
6.9.2 Preparación de los inóculos .....	49
6.9.3 Plan de trabajo.....	50
6.9.4 Descripción de los experimentos .....	52
6.9.4.1 Experimento 1: Uso de Oxígeno puro.....	52
6.9.4.2 Experimento 2: filtros para la colecta de materia orgánica (Fibra scotch) .....	53

6.9.4.3 Experimento 3: Uso de sistema filtros para la colecta de materia orgánica .....	53
6.9.4.4 Experimento 4: Uso de bombas peristálticas (alimentadores continuos).....	54
6.9.4.5 Experimento 5: Alimento (Selco 3000®-Selco Plus ®).....	54
6.9.4.6 Experimento 6: Alimento (Selco Plus ®- Ori Culture Dr. Miels King).....	54
6.9.4.7 Experimento 7: Flujo continuo de agua .....	55
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
<b>7.1 CALIBRACION DEL ELECTRODO DE AMONIO.....</b>	<b>59</b>
<b>7.2 Cadena de Producción de Rotíferos.....</b>	<b>60</b>
7.2.1 Trabajos de limpieza y desinfección fundamentales acometidos:.....	60
7.2.2 Alimentación de los cultivos de rotíferos: .....	60
7.2.3 Estado del cultivo de los rotíferos .....	61
<b>7.3 Experimentos .....</b>	<b>62</b>
7.3.1 Experimento 1: Uso de Oxigeno puro.....	62
7.3.2 Experimento 2:	
filtros para la colecta de materia orgánica (Fibra“Scotch Bright”).....	67
7.3. 3 Experimento 3:	
Uso de sistema filtro tipo “air-lift” para la colecta de materia orgánica .....	72
7.3.4 Experimento 4: Uso de bombas peristálticas (alimentadores continuos).....	78
7.3.5 Experimento 5: Alimento (Selco 3000®-Selco Plus ®).....	84
7.3.6 Experimento 6: Alimento (Selco Plus ®- Ori-Culture®).....	88
7.3.7 Experimento 7: Flujo continuo de agua .....	94
7.4 EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN 1.2 m <sup>3</sup> .....	99
<b>8. FACTIVILIDAD ECONOMICA.....</b>	<b>104</b>
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
<b>9.1 TRABAJOS PREVIOS AL CULTIVO INTENSIVO .....</b>	<b>111</b>
<b>9.2 INFLUENCIA DEL USO DE OXIGENO PURO .....</b>	<b>112</b>
<b>9.3 USO DE SISTEMAS DE FILTRADO EN BANDA (Fibra) .....</b>	<b>114</b>
<b>9.4 USO DE UN SISTEMA FILTRO TIPO .....</b>	<b>114</b>
<b>9.5 USO DE BOMBAS PERISTÁLTICAS COMO ALIMENTADORES .....</b>	<b>115</b>
<b>9.6 DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTO.....</b>	<b>117</b>
<b>9.7 FLUJO CONTINUO DE AGUA.....</b>	<b>118</b>
<b>9.8 EXPERIENCIA DE PRODUCCIÓN MASIVA DE ROTÍFEROS EN TANQUES</b>	
<b>DE 1200 l. ....</b>	<b>119</b>
<b>9.9 COSTOS BENEFICIO .....</b>	<b>119</b>
<b>9.10 METAS Y LOGROS.....</b>	<b>120</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>121</b>
<b>11. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>123</b>
<b>12. REFERENCIAS .....</b>	<b>125</b>



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Intervalo de factores físico químicos aceptables para el cultivo de rotíferos.	14
Tabla 2.- Alimentación sugerida con Selco 3000 para el cultivo de rotíferos.....	21
Tabla 3.- Alimentación sugerida con Selco Plus® para el cultivo de rotíferos.....	21
Tabla 4.- Soluciones madre para preparar Oligoelementos.....	28
Tabla 5.- Solución de Sales.....	29
Tabla 6.- Formalina neutralizada.....	30
Tabla 7.- Cantidades de agua marina 35%o y agua dulce 0%o para cada uno de los tanques.....	34
Tabla 8.- Fertilizantes para microalgas en volúmenes mayores de 15 l (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001).....	41
Tabla 9.- Cronograma de actividades durante los experimentos.....	51
Tabla 10.- Alimentación suministrada de alimento artificial.....	52
Tabla 11.- Registro de datos experimentales.....	57
Tabla 12.- Costos de fertilizantes para microalgas.....	105
Tabla 13.- Costos de reactivos para preparar Oligoelementos y Sales.....	105
Tabla 14.- Costos de producción de inóculos $250 \times 10^6$ rotíferos.....	106
Tabla 15.- Costos de insumos para la Producción intensiva de rotíferos.....	107
Tabla 16.- Alternativas de costos de producción intensiva de rotíferos (en pesos).....	108

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema de los ciclos de reproducción en rotíferos.....	10
Fig. 2 Rotífero <i>Brachionus rotundiformis</i> portando huevos adheridos a la parte posterior del cuerpo.....	11
Fig. 3 Planta piloto de 11 x 14 m.....	31
Fig. 4 Área de cultivo de rotíferos dentro de la planta piloto.....	31
Fig. 5 Tanque cilindro-cónicos de fibra de vidrio blancos de 1200 l.....	32
Fig. 6 Columnas de fibra de vidrio translucidas con capacidad de 80 l / Garrafrones de 20 l .....	32
Fig. 7 Matras de 2 l.....	32
Fig. 8 Tanque cilíndricos de 7000 l.....	33
Fig. 9 Tanque cilindro-cónicos de 100 l.....	33
Fig. 10 Tanques de cabecera de suministro y sistema de filtro de arena y cartucho.....	34
Fig. 11 Compresores tipo soplador (“blower”) de 10 HP.....	35
Fig. 12 Mangueras pegadas con silicóna a contrapesos para cultivos de microalga.....	36
Fig. 13 Difusores de aire colocados en el cultivo de rotíferos.....	36
Fig. 14 Lámpara ultravioleta (VH-9282L) de flujo continuo de 60,000 $\mu\text{W.s/cm}^2$ .....	37
Fig. 15 filtros con elevación del agua por aire (air-lift).....	38
Fig. 16 Cosechador.....	39
Fig. 17 Cultivo en cadena o desdoblamiento.....	40
Fig. 18 Organigrama del uso de las instalaciones.....	43
Fig. 19 Medidor de flujo conectado al regulador de los cilindros de $\text{O}_2$ .....	43
Fig. 20 Pipeta despuntada y cámara de conteo.....	47
Fig. 21 Bombas peristálticas.....	47
Fig. 22 Sistema de filtrado para flujo continuo.....	55

Fig. 23 Curva comparativa de calibración de amonio.....	59
Fig. 24 Rotífero con gran cantidad de huevos.....	61
Fig. 25 Densidad de rotíferos (número/ml) durante el experimento del uso de Oxígeno puro.....	62
Fig. 26 A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de oxígeno puro.....	63
Fig. 27 Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de oxígeno puro.....	64
Fig. 28 Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de oxígeno puro.....	64
Fig. 29 Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de oxígeno puro.....	65
Fig. 30 Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de oxígeno puro.....	66
Fig. 31 Tasa de crecimiento en cada uno de los tanques en el experimento de uso de oxígeno puro.....	66
Fig. 32 Densidad de rotíferos (número/ml) durante el experimento del uso de filtros (Fibra “Scotch Bright”) de materia orgánica.....	67
Fig. 33 A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros (Fibra “Scotch Bright”) de materia orgánica.....	68
Fig. 34 Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros (Fibra “Scotch Bright”) de materia orgánica.....	69
Fig. 35 Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros (Fibra “Scotch Bright”) de materia orgánica.....	70
Fig. 36 Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de	

filtros (Fibra “Scotch Bright”) de materia orgánica.....	71
Fig. 37 Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de filtros (Fibra “Scotch Bright”) de materia orgánica.....	71
Fig. 38 Tasa de crecimiento en cada uno de los tanques en el experimento de uso de filtros (Fibra “Scotch Bright”) de materia orgánica.....	72
Fig. 39 Densidad de rotíferos (número/ml) durante el experimento del uso de filtros de materia orgánica.....	73
Fig. 40 A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros de materia orgánica.....	74
Fig. 41 Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros de materia orgánica.....	75
Fig. 42 Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros de materia orgánica.....	75
Fig. 43 Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de filtros de materia orgánica.....	76
Fig. 44 Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de filtros de materia orgánica.....	77
Fig. 45 Tasa de crecimiento en cada uno de los tanques en el experimento de uso de filtros de materia orgánica.....	78
Fig. 46 Densidad de rotíferos (número/ml) durante el experimento del uso de alimentador.....	79
Fig. 47 A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de alimentador.....	80
Fig. 48 Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de alimentador.....	81

Fig. 49 Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de alimentador.....	81
Fig. 50 Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de alimentador.....	82
Fig. 51 Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de alimentador.....	83
Fig. 52 Tasa de crecimiento en cada uno de los tanques en el experimento de uso de alimentador.....	83
Fig. 53 Densidad de rotíferos (número/ml) durante el experimento del uso de Selco Plus®.....	84
Fig. 54 A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de Selco Plus®.....	85
Fig. 55 Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de Selco Plus®.....	86
Fig. 56 Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de Selco Plus®.....	86
Fig. 57 Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de Selco Plus®.....	87
Fig. 58 Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de Selco Plus®.....	87
Fig. 59 Tasa de crecimiento en cada uno de los tanques en el experimento de uso de Selco Plus®.....	88
Fig. 60 Densidad de rotíferos (número/ml) durante el experimento de alimento.....	89
Fig. 61 A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de alimento.....	90
Fig. 62 Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de alimento.....	91

Fig. 63 Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de alimento.....	91
Fig. 64 Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de alimento.....	92
Fig. 65 Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de alimento.....	93
Fig. 66 Tasa de crecimiento en cada uno de los tanques en el experimento de alimento.....	93
Fig. 67 Densidad de rotíferos (número/ml) durante el experimento del uso de flujo continuo.....	94
Fig. 68 A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de flujo continuo.....	95
Fig. 69 Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de flujo continuo.....	96
Fig. 70 Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de flujo continuo.....	96
Fig. 71 Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de flujo continuo.....	97
Fig. 72 Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de flujo continuo.....	98
Fig. 73 Tasa de crecimiento en cada uno de los tanques en el experimento de flujo continuo.....	99
Fig. 74 Densidad de rotíferos (número/ml) durante la validación en 1200 l.....	100
Fig. 75 A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada una de las replicas durante la validación en 1200 l.....	101
Fig. 76 Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada en cada una de las replicas durante la validación en 1200 l.....	102
Fig. 77 Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada en cada una de las replicas durante la validación en 1200 l.....	102

Fig. 78 Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de alimento.....	103
Fig. 79 Temperaturas máximas y mínimas durante la validación en 1200 l.....	103
Fig. 80 Tasa de crecimiento en cada en cada una de las replicas durante la validación en 1200 l...	104
Fig. 81 Comparativo fotográfico del uso de filtros.....	116

## RESUMEN

Con el fin de incrementar la producción de rotíferos de la especie *Brachionus rotundiformis* hasta 1000/mL se puso en marcha una área piloto implementando la infraestructura necesaria para realizar siete experimentos en tanques cilindro-cónicos de 100 l, cada uno con dos tratamientos por triplicado en tanques cilindro-cónicos de 100 l: O<sub>2</sub>, filtros-2, bombas, alimento-2, flujo continuo. Concluyendo con la extrapolación de los mejores resultados en tanques de 1.2 m<sup>3</sup>, con densidades iniciales de siembra ( $\geq 250$  rotíferos/ml). Se monitorearon los parámetros ambientales más importantes: temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH y amonio no ionizado. Se mejoraron las técnicas de producción de rotíferos de la especie *Brachionus rotundiformis*, con el uso general del oxígeno puro y los filtros utilizados se mantuvieron los niveles de amonio bajos y una tasa de crecimiento favorable. Se demostró que para el buen desarrollo del cultivo por lotes, uno de los requisitos es suministrar el alimento artificial de manera gradual. Se probaron tres alimentos artificiales (Selco Plus®, Ori-Culture® y Selco 3000®) siendo el más efectivo el Selco Plus®. El recambio de agua beneficia la tasa de crecimiento, manteniendo mejores niveles de oxígeno disuelto y menores niveles de amonio no ionizado. La densidad que alcanzan los cultivos de rotíferos con las técnicas de cultivo por lotes dependen de las condiciones ambientales y la alimentación, si se mejora la calidad del agua, disminuye el estrés de la población que aumenta con las altas densidades y se beneficia la tasa de crecimiento. Se espera poder establecer un protocolo de cultivo intensivo adaptado a las condiciones de quien requiera altas densidades de rotíferos (1,000 – 2,000 rotíferos/ml) que asegure la alimentación de las primeras etapas larvales de organismos de importancia científica o comercial en su cría masiva.

## SUMMARY

With the purpose of increasing the rotifer production of the *Brachionus rotundiformis* species up to 1000/mL, a pilot area was set off, implementing the necessary infrastructure to carry out seven experiments in 100 l, cylinder-conical tanks, each having two triplicate treatments in 100 l cylinder-conical tanks: Oxygen, filters-2, pumps, food-2, continuous flow. The experiments conclude with the extrapolation of the best results in 1.2 m<sup>3</sup> tanks, with ( $\geq 250$  rotifers/ml) sowing initial densities. The most important environmental parameters were monitored: temperature, salinity, dissolved oxygen, pH and non ionized ammonium. Production techniques of the *Brachionus rotundiformis* rotifers species were improved with the general use of pure oxygen, and the filters that were used. Ammonium levels were kept low and a favorable growth rate was achieved. It was established that in order to get a good development of the culture by batch, one of the requirements was that the artificial food had to be gradually provided. Three artificial foods (Selco Plus®, Ori-Culture® and Selco 3000®) were tested, being Selco Plus® the most effective. Water refill benefits the growth rate, maintaining better dissolved oxygen levels and lower non ionized ammonium levels. The density reached by the rotifer cultures using batch culture techniques depends on the environmental conditions and the feeding. When water quality improves, the population stress, increased when densities are high, diminishes and growth rate profits from that drop. The intention is to be able to implement an intensive culture protocol adapted to the conditions of those who require high rotifer densities (1.000 - 2.000 rotifers/ml), ensuring the feeding of the first larval stages of scientific or commercial importance organisms in their massive breeding.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENERALIDADES

Actualmente la preocupación de diferentes sectores sociales ante la situación crítica en las esferas económica, social y ambiental por la que atraviesa la humanidad hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que favorezcan la protección, conservación y uso adecuado de los recursos naturales, en especial en regiones bajo fuertes presiones ambientales, sociales y económicas. Este es el caso, en general, de los países tropicales con alta diversidad biológica y mayoritariamente subdesarrollados. México, por ejemplo, alberga el 10% de la biodiversidad mundial (Toledo, 1988).

Una de las vías que se está desarrollando para enfrentar esas situaciones es el cultivo de organismos acuáticos: la acuicultura, que es la única vía para incrementar significativamente la producción acuática en el mundo, y presenta un desarrollo más lento en sistemas de agua salobre y salada que en agua dulce (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001); sin embargo, la tendencia actual muestra un crecimiento sostenido de la maricultura, en el cual, el cultivo de peces tiene un gran potencial para aportar el mayor porcentaje de la producción, como sucede en la acuicultura de agua dulce.

El cultivo de organismos marinos es una actividad en constante desarrollo debido a la alta demanda de sus productos. El éxito de esta industria depende en gran parte del conocimiento y manejo de los aspectos de carácter reproductivo (Bernabé, 1991; Beveridge, 1996), siendo una parte esencial la cría de larvas y la producción del alimento vivo, que en el caso de muchos organismos marinos, los rotíferos constituyen el más importante (Fukusho, 1989a, b).

La República Mexicana es un país con un alto potencial para el desarrollo de la acuicultura. Cuenta con 11 mil kilómetros de litorales ([www.presidencia.gob.mx](http://www.presidencia.gob.mx), 2005) que pueden ser explotadas, así como con una gran variedad de organismos nativos con un potencial pesquero y acuícola. Sin embargo, la mayoría de las pesquerías comerciales están sobre explotadas y la acuicultura marina se ha enfocado fundamentalmente a algunas especies de crustáceo

En la actualidad, la acuicultura marina a nivel comercial en México está en una fase preliminar, sin embargo, existe interés por parte de empresarios y de instituciones nacionales que se han preocupado por buscar alternativas al cultivo de especies tradicionales, realizando varios estudios con el fin de lograr el desarrollo de cultivos de importancia comercial a nivel mundial (Civera *et al.*, 2002).

El principal prerequisite para el establecimiento, desarrollo y extensión de la acuicultura en general, es disponer de las cantidades necesarias de juveniles, con la calidad requerida, en los momentos necesarios y a un costo razonable (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 1994), por lo que diversas instituciones del mundo trabajan para desarrollar las tecnologías de producción masiva de juveniles, entre ellos México, como se aprecia en los debates de la reunión nacional sobre cultivo de peces marinos (Hernández-Martínez, 2002).

En Cuba se diseñó una instalación experimental y piloto para servir de base al desarrollo de tecnologías (“know-how”) dentro de las cuales esta considerado como parte importante el cultivo de alimento vivo en el curso de dos proyectos de asistencia técnica de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), PCT/CUB/0052 y PCT/CUB/0051, por los consultores G. Cittolin y R. Guidastrì (Servizi Tecnici in Maricoltura, Italia y los autores de un manual sobre el mismo con las características esenciales, técnicas a aplicar y el programa de trabajo (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 1994) y posteriormente otro de mayor alcance en América Latina y el Caribe (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001). Muchos de estos aspectos se tomaron en cuenta para la adaptación de técnicas para el cultivo intensivo de rotíferos por contener diversos elementos prácticos, especialmente los basados en esas experiencias.

## 1.2 ALIMENTO VIVO

A menudo algunas personas consideran el cultivo del alimento vivo como algo secundario; sin embargo, es tan importante que debe tratarse como un elemento clave o esencial, algo así como la llave que le permitirá llegar o no al final de su objetivo.

El desarrollo del cultivo de organismos marinos está limitado por la disponibilidad de juveniles, cuyas técnicas de producción controlada dependen en gran medida de la alimentación larval, uno de los puntos más críticos del cultivo de estos organismos; las altas mortalidades y crecimientos inadecuados que suelen estar presentes son en gran medida debidas a una alimentación inadecuada (Yúfera y Pascual, 1984; Eda *et al.*, 1990).

De acuerdo a sus hábitos alimentarios, la mayoría de las larvas carnívoras depredadoras solo aceptan presas móviles, por lo que tienen problemas en la aceptación del alimento inerte; por otra parte, las larvas no tienen un estómago bien desarrollado (Zambonino-Infante *et al.*, 1996) y además se ha comprobado una pobre actividad enzimática inicial (Peña-Martínez y Dumas, 1998), lo que ocasiona una mala digestión de las fórmulas alimentarias existentes (Perdersen *et al.*, 1987; Perdersen y Hjelmeland, 1988). Hay diversos factores que determinan el alimento que las larvas requieren, entre ellos la talla, disponibilidad, aceptación, valor nutricional, digestibilidad e incluso la selección que las larvas hacen por las presas disponibles, tomando en cuenta el grado de saciedad y apetito de la larva; esto depende de la abundancia del alimento, por lo que no basta con que un alimento vivo sea del tamaño adecuado para ser capturado, si no además de todo lo anterior también deben ser tomadas en cuenta características, como el olor, gusto, textura, movimiento y valor nutricional.

En la actualidad aún no a sido posible formular alimentos artificiales adecuados para utilizarse como único alimento desde la primera la alimentación exógena, ya que se requieren presas de 50 – 100  $\mu\text{m}$ , con diversas características muy específicas en las primeras etapas y por ello se mantiene la dependencia fundamental de organismos vivos. Entre las investigaciones enfocadas a la producción de alimento vivo para la acuicultura, se

han estudiado un número elevado de taxas de animales y vegetales, entre los cuales destacan las microalgas como *Chaetoceros* spp, *Chlorella* spp, entre otros; copépodos (calanoides y harpacticoides), branquiópodos (cladóceros y anostracos) y los rotíferos, principalmente del género *Brachionus* (Lavens y Sorgeloos, 1996).

En una primera etapa se utilizaron los nauplios de *Artemia*. No obstante, que su uso ha significado un gran progreso en la larvicultura de algunas especies de peces marinos, en una gran mayoría de las larvas de organismos marinos no se puede suministrar como primer alimento los nauplios de *Artemia*, debido a que la abertura bucal de las larvas es muy pequeña y necesitan organismos de menor tamaño; por otra parte, se han documentado las dificultades que se presentan con las cápsulas y quistes de *Artemia* no eclosionados, que causan obstrucción intestinal e incluso ruptura del abdomen (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 1991).

El alimento vivo es un tema prioritario dentro del conjunto de actividades del equipo que realice la investigación y/o producción de los juveniles de organismos marinos y no una mera área de servicios llevada a cabo por un personal ajeno al grupo y de menor importancia o categoría, puesto que un alimento vivo en la cantidad, calidad y momento requerido puede lograr crías exitosas aún cuando las condiciones en que se desarrolle la larvicultura no sean las mejores y por el contrario, un alimento que no cumpla los requerimientos anteriores hace que larvas provenientes de buenos reproductores y excelentes desoves, en condiciones óptimas de cría, no lleguen al final de la larvicultura o lleguen en un estado pésimo de estrés y malformaciones (Alvarez-Lajonchère y Hernández-Molejón, 2001).

Los organismos más adecuados para ser utilizados como alimento vivo deben cumplir muchos de los siguientes requerimientos, según Hernández Molejón y Alvarez-Lajonchère (en prensa):

- Ciclo de vida corto
- Tolerancia a intervalos amplios de parámetros abióticos.
- Resistencia a manipulación, contaminación con otras especies y enfermedades.
- Que su cultivo masivo sea seguro, rentable y productivo.

- Alto valor nutricional (en dependencia de su composición química y de los requerimientos nutricionales de las especies a alimentar).
- Disponibilidad y aceptabilidad.
- Que puedan cultivarse a altas densidades y volúmenes adecuados a las necesidades.
- Tamaño acorde a los requerimientos de los organismos a ser alimentados.
- Fácil digestibilidad por parte de los organismos que se van a alimentar.

Sobre el alimento vivo se han publicado diversos manuales para su producción y utilización en la cría de larvas y juveniles de los principales grupos de especies acuáticas de interés: moluscos, crustáceos y peces, tanto de agua dulce como salobre y salada. Entre los más recientes se destaca el de Lavens y Sorgeloos (1996) y el de Stottrup y McEvoy (2003), que constituyen consultas obligatorias sobre este tema.

El cultivo de rotíferos por parte de los investigadores japoneses es lo que ha permitido el gran avance que se ha tenido en ese país y luego en el mundo con respecto al cultivo de especies marinas (Fukusho, 1989a, b). El cultivo intensivo de rotíferos es uno de los trabajos de gran interés en lo que se refiere a la producción de alimento vivo, así como la producción masiva de huevos durmientes (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001), en Japón es bien conocido que la producción de larvas de peces está limitada por la producción de rotíferos (Hirata y Mocawa 1983) y es por este motivo que hay gran interés en conocer su biología y sus requerimientos, para poder de esta manera optimizar su cultivo (Fukusho, 1969, 1983; Fu *et al.* 1991; Arnold y Holt, 1991; Duray *et al.* 1996; Sarma y Nandini, 1998) y actualmente es uno de los más importantes alimentos usados en larvicultura; esto, a partir del desarrollo de tecnologías para la producción masiva de ellos (Fukusho, 1989a, b). Se conocen diversas especies de rotíferos, pero las que más se utilizan son *Brachionus plicatilis* y *B. rotundiformis*.

Los rotíferos presentan valiosas ventajas sobre otros organismos estudiados, entre las que destacan:

- Son animales rústicos de una gran plasticidad ecológica por soportar amplios intervalos en los parámetros ambientales como temperatura, salinidad, pH y oxígeno.
- Son cosmopolitas.

- Admiten diversas alternativas de cultivo.
- Pequeño tamaño ( $\approx 100 - 400 \mu\text{m}$ ), movimientos suaves y hábito de quedar suspendidos en la columna de agua, lo cual permite a las larvas de peces ingerirlos.
- Ciclo de vida corto.
- Reproducción asexual y sexual, esta última con formación de huevos durmientes, enquistados o latentes (en inglés “resting eggs”).
- Alta longevidad y resistencia de sus huevos durmientes.
- Son polívoros, por lo que la alimentación es fácil y de bajo costo.
- Alta velocidad de reproducción (en condiciones óptimas puede duplicarse la población en menos de 24 horas).
- Admite altas densidades en cultivo.
- Actúan como biocápsulas y a través de ellos se suministran a las larvas microalgas, ácidos grasos polinsaturados (PUFA), vitaminas, medicamentos; pueden ser enriquecidos con emulsiones que contienen ácidos grasos esenciales con ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), que ingieren, funcionando como cápsulas vivientes, transfiriendo estas sustancias a las larvas.

Otra característica importante de los rotíferos es que aceptan una amplia variedad de alimentos, de hecho se ha encontrado que filtran con igual eficiencia partículas de diversos tamaños, entre  $2$  y  $17 \mu\text{m}$  aproximadamente, aunque pueden ingerir partículas de hasta  $30 \mu\text{m}$  (Alvarez-Lajonchère y Hernández-Molejón, 2001).

En las instalaciones experimentales del CIAD las producciones más altas del cultivo masivo de rotíferos *B. rotundiformis* han sido menores a  $600$  rotíferos/ml por Velasco y Duncan (2002), Guzmán (2004) y Sánchez (2006). No obstante, hay cultivos a altas densidades que utilizan recirculación de agua y logrando producciones de  $2,800$  y hasta  $8,000$  rotíferos/ml con Culture Selco Plus® en 11 días (Dhert y Sorgeloos 1999) o incluso cultivos muy intensivos con densidades de hasta  $7,000$  rotíferos/ml y producciones diarias de más de  $2,500$  rotíferos/ml durante tres semanas (Suantika et al 2003a,b) o los ultra-densos de hasta  $1.6 \times 10^5$  rotíferos/mL (Yoshimura et al 2003).

Se han cultivado con microalgas (no aceptan bien las diatomeas), bacterias, protozoos, levaduras y dietas artificiales, la cantidad y la calidad del alimento juegan un papel

importante en el crecimiento de los rotíferos y en su valor nutricional. También, se ha tratado de reemplazar la dieta natural (microalgas) con dietas inertes, principalmente levaduras, aunque los estudios han demostrado que las larvas presentan un menor porcentaje de supervivencia cuando son alimentadas con rotíferos cultivados con levadura. Por lo que se ha concluido que las levaduras no pueden sustituir a las microalgas para utilizar directamente los rotíferos, ya que con estas dietas se producen rotíferos de menor valor nutricional (Watanabe *et al.*, 1978).

El cultivo de rotíferos presenta algunos problemas relacionados a su calidad nutricional principalmente, como por ejemplo, bajos niveles de ácido eicosapentaenoico (EPA: 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA: 22:6n-3). Se ha dado mayor interés en cubrir la deficiencia de estos ácidos grasos por lo que se han desarrollado varios productos comerciales con el objetivo de incrementar su contenido de grasas y vitaminas (Coutteau y Sorgeloos, 1997).

El alimento vivo representa uno de los sectores principales en la producción de juveniles, desde el punto de vista práctico en que si no existe alimento no hay crecimiento ni un correcto desarrollo y la mortalidad tiende a ser alta en el resto de los estadios del desarrollo y siendo los rotíferos los que presentan valiosas ventajas sobre otros organismos estudiados es que se decidió adaptar las técnicas de cultivo intensivo del rotífero *Brachionus rotundiformis* a las condiciones del área piloto del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán en Sinaloa, tomando en cuenta los trabajos realizados en dicha institución con anterioridad (Velasco y Duncan, 2002, Guzmán, 2004 y Sánchez, 2006) y muchos aspectos del manual de Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón (2001).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. GENERALIDADES

En 1955 se descubrió en Japón que el fenómeno “Mizukawari” era causado por densas poblaciones de rotíferos que consumían en su totalidad el fitoplancton de los estanques y demostró que es un alimento excelente para las larvas de varias especies de moluscos, crustáceos y peces con etapas de desarrollo zooplantófagas y en el año de 1965, se confirmó su valor como alimento en la cría de la dorada japonesa *Pagrus major* (Fukusho, 1989a; Fulks y Main, 1991).

Por su tamaño ( $\approx 100 - 400 \mu\text{m}$ ), movimientos y hábito de quedar suspendidos en la columna de agua, los rotíferos son ideales para ser utilizados como el primer alimento en la producción de larvas de muchos organismos marinos ya que las larvas pueden capturarlos e ingerirlos fácilmente. Por lo que su cultivo se a convertido en un elemento crítico e indispensable y es un factor clave en el desarrollo de la producción masiva de juveniles de organismos marinos (Lubzens, 1987; Fukusho, 1989a, b; Fulks y Main, 1991; Tucker, 1998; Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001).

La demanda en la producción de rotíferos, ha obligado al desarrollo de técnicas intensivas de cultivo con el fin de satisfacer no solo la cantidad si no también la calidad nutricional que es uno de los principales factores en la producción de larvas de moluscos, crustáceos y peces (Fu *et al.*, 1997; Sarma, 1991a). De igual manera Yoshimura *et al.* (1997), diseñaron un sistema para cultivar rotíferos a altas densidades, alimentados con microalgas concentradas y con el uso de equipo de filtración para retener la materia orgánica así como el detrito y bacterias.

El desarrollo en las técnicas de cultivo de rotíferos ha tenido avances significativos. En la década de los 80s, los cultivos por lotes (Walz, *et al.*, 1997) y los semi-continuos fueron de los más utilizados (Snell, 1991). Actualmente, se han desarrollado métodos más sofisticados como el cultivo continuo a altas densidades con el suministro de dietas artificiales, en los cuales se pueden obtener decenas de miles de rotíferos por mililitro (Yoshimura *et al.*, 1994; 1997; Fu *et al.*, 1997). Existe un cultivo de ultra alta densidad que emplea filtros de  $0.4 \mu\text{m}$  y oxígeno puro alcanzando una densidad de  $1.6 \times 10^5$  rotíferos por



mililitro (Yoshimura *et al.*, 2003); sin embargo, uno de los problemas importantes en este tipo de cultivo es la calidad del agua, que se deteriora rápidamente con los desechos orgánicos generados por la gran cantidad de organismos y el alimento suministrado (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001).

En muchos centros de maricultura, sobre todo en Japón, se utilizan filtros dentro de los tanques de cultivo de rotíferos para eliminar impurezas y excreciones, lo que reduce el número de bacterias y amonio no ionizado ( $\text{NH}_3$ ). Los filtros son muy necesarios a partir de densidades de más de 200 - 500 rotíferos/ml, debido a que la materia orgánica eleva la carga bacteriana, disminuye mucho el pH y el oxígeno y aumenta los niveles de amonio, especialmente el no ionizado que es la forma más tóxica. En algunos casos se usan pequeños reservorios perforados, llenos de algunos materiales tales como gravilla, conchas de moluscos, fibras sintéticas, entre otros, a través de los cuales pasa el agua movida por un mecanismo de elevación por aire (en inglés “air-lift”) (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001).

Por otra parte, se ha demostrado que los cultivos de rotíferos en medios asépticos crecen menos que con una pequeña flora bacteriana; debido a que hay bacterias productoras de vitamina  $\text{B}_{12}$  que ayuda al desarrollo del cultivo. La mayor parte de la vitamina  $\text{B}_{12}$  transferida a los rotíferos es aportada por las bacterias (Lavens y Sorgeloos, 1996).

Para disminuir la cantidad de bacterias oportunistas como lo son las Vibrionaceas, que pasan a las larvas a través del alimento, se han utilizado bacterias no patógenas en los cultivos de rotíferos con *Lactobacillus plantarum* (Gatesoupe, 1991). Estas bacterias probióticas no solo regulan la microflora, sino también incrementan la tasa de producción de los rotíferos por que proporcionan vitamina  $\text{B}_{12}$ , lo cual aumenta el valor del rotífero como alimento, pues el peso promedio mejora, lo que a su vez se ve reflejado en el crecimiento de las larvas de los moluscos, crustáceos y peces. Otro de los beneficios de las bacterias lácticas es que son las primeras en colonizar el tracto digestivo de las larvas contribuyendo a un mejor desarrollo, evitando que sean las bacterias patógenas las que puedan predominar (Planas y Cunha, 1999).

Los rotíferos son dioicos. En su ciclo de vida existe alternancia de generaciones en la reproducción sexual (míctica) en la que las hembras pueden ser fertilizadas y asexual



temperaturas más altas, 28 - 35°C, *B. plicatilis* a temperaturas más bajas, de 18 - 25°C, mientras que los pequeños crecen a razón de 250% a 34°C y los grandes crecen a razón de 170% como máximo a 25°C (Fukusho, 1989a, b).

El uso de *B. plicatilis* en la alimentación de las larvas requiere entre cuatro - cinco rotíferos  $\text{ml}^{-1}$ , mientras que con *B. rotundiformis* se necesitarán dos ó tres veces más organismos (Watanabe, 1982). Los pequeños son los más indicados en los primeros días de alimentación por el tamaño de las bocas de las larvas.

Los rotíferos llegan a adultos después de 12 a 36 horas y comienzan a poner huevos cada 4 - 6 h, dependiendo de los factores físico-químicos del cultivo. El sistema reproductor de la hembra consta de un solo ovario situado en la parte anterior del pseudo-celoma en el que existen de 10 - 20 núcleos en el que cada uno de estos formara un huevo; por lo que una hembra puede producir hasta 20 huevos durante sus nueve a diez días de vida, madurando hasta cinco huevos a la vez, portándolos en la porción posterior del cuerpo hasta su nacimiento (Hoff y Snell, 1989). Las hembras de *B. plicatilis* portan los huevos adheridos a la parte posterior de su cuerpo y las de *B. rotundiformis* separados de la lórica (Fig. 2) (Okauchi y Fukusho, 1985).



Fig. 2. Rotífero *Brachionus rotundiformis* portando huevos adheridos a la parte posterior del cuerpo.

Las hembras míticas producen huevos que si no se fertilizan, son significativamente menores y de ellos emergen machos; pero si estas hembras son fertilizadas, entonces

producirán huevos de mayor tamaño, que son durmientes, también llamados huevos de invierno, análogos a los quistes de *Artemia*. La producción de huevos durmientes se incrementa cuando la alimentación de los rotíferos se realiza con altas densidades de microalgas, sobre todo con microalgas congeladas (Lubzens *et al.*, 1995; Balompagueng *et al.*, 1997; Kagone *et al.*, 1997). Los huevos durmientes son más grandes (110  $\mu\text{m}$  aproximadamente) que los huevos puestos por las hembras en su ciclo asexual; son ovoides a esféricos, oscuros, opacos, la parte externa con estructuras en forma de espinas; la cubierta tiene tres capas, la segunda es de quitina, densa y compacta. La porosidad es reducida, de forma tal que pueden resistir acciones de enzimas digestivas de depredadores. Cuando éstos encuentran nuevamente condiciones óptimas eclosionan (a las 24 horas a 25‰), comenzando la reproducción asexual nuevamente (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001).

## 2.2 CONDICIONES AMBIENTALES DE CULTIVO

El intervalo de salinidad para el cultivo con mejores resultados está entre 10 y 25‰ (Tabla 1). La dilución con agua dulce aumenta el número de hembras y la producción de huevos. Altas salinidades suprimen la reproducción y también disminuyen la tasa de filtración e ingestión (Lubzens, 1987). Un medio hipersalino, afecta metabólicamente, la cepa reduciendo el consumo de oxígeno y la actividad natatoria. Se han encontrado niveles más altos de ácidos grasos altamente insaturados (PUFA) en rotíferos cultivados a baja salinidad en *B. plicatilis* a 30‰ y en *B. rotundiformis* los mejores resultados entre 15 y 20‰ (James y Abu-Rezeq, 1990). El fotoperíodo más adecuado es de 16 hrs. de luz y 8 hrs. de oscuridad, con una intensidad de 2000 a 5000 lux (Hoff y Snell 1989).

En el mundo se han acumulado muchas experiencias sobre el cultivo de rotíferos y Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón (2001) resumieron muchas de éstas, así como de sus propios trabajos respecto a las condiciones ambientales para el cultivo de rotíferos, de cuya fuente se han tomado los siguientes elementos:

- En cuanto a la temperatura, se recomienda un intervalo de 20 - 30°C, pero hay cepas termófilas con mejores rendimientos a 30 - 35°C (Tabla 1), al igual que en la mayoría de los organismos la temperatura influye en la alimentación (filtración), reproducción y

el metabolismo en general. Temperaturas menores de 20°C no son favorables para la reproducción de *B. rotundiformis*, que se cultiva mejor a temperaturas de 32 - 34°C. En cuanto al tamaño, a mayor temperatura menor talla; sin embargo, las altas temperaturas aumentan la tasa metabólica y el consumo de oxígeno.

- Con un pH entre 7.5 y 8.5 (Tabla 1) se han logrado los mejores resultados. Si el pH es alto por exceso de microalgas, éste retarda la reproducción y se puede disminuir en los cultivos con ácido acético antes de inocular los rotíferos.
- Altas concentraciones del amonio no ionizado ( $\text{NH}_3$ ) son características de pH elevados. El amonio no ionizado es el compuesto nitrogenado más dañino que se produce por la descomposición bacteriana de la materia orgánica y de la excreción de organismos heterótrofos. Hay una correlación entre altas concentraciones de éste y bajas densidades de rotíferos en los cultivos masivos. Con niveles de 2.3 ppm de amonio libre, se afecta la producción de huevos, con lo que se reduce al 50% el crecimiento de la población y la actividad natatoria, mientras que una concentración de amonio alta (3.2 ppm) puede causar la muerte del 50% de la población en 24 horas. Se recomienda que las concentraciones de amonio no ionizado no excedan 1.0 ppm (Tabla 1); sin embargo, Lubzens (2003) considera 10 ppm y Stottrup y McEvoy (2003) considera aceptables niveles de 6-10 ppm
- Alimentados con microalgas necesitan menos aireación, porque el alga produce oxígeno. Alimentados con levaduras, las bacterias que se generan consumen mucho oxígeno. Fulks y Main (1991) señalaron que se necesitan entre 60 - 100 l/min/m<sup>3</sup> en cultivos que se alimentan con levadura, mientras que en cultivos altamente intensivos se utiliza oxígeno puro para mantener un nivel de 10 a 15 ppm (Tabla 1) (Candrea et al., 1996).
- El nivel de oxígeno disuelto óptimo está entre 5 y 7 ppm (Tabla 1), aunque alimentados con *Nannochloropsis oculata*. los rotíferos pueden vivir a concentraciones más bajas, hasta de 2 ppm, (Fukusho, 1989a), mientras que si la aireación es mala y el alimento es levadura, éste se sedimenta, los animales ayunan y disminuye la fertilidad y el crecimiento de la población. Por otra parte, la aireación intensa puede causar el desprendimiento de los huevos de las hembras con huevos y provoca la formación de

espuma en medios con muchos detrito, lo que retiene a los rotíferos en la superficie y mueren por desecación, produciendo un descenso en la población (Guzmán, 2004); por lo tanto, la aireación debe ser moderada, la suficiente para mantener las partículas alimentarias en suspensión y asegurar niveles adecuados de O<sub>2</sub>.

Tabla 1.- Intervalo de factores físico químicos aceptables para el cultivo de rotíferos.

<b>Parámetro</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>
O <sub>2</sub>	5ppm	7ppm
O <sub>2</sub> Puro	10ppm	15ppm
T°C	30	35
Salinidad	10‰	25‰
pH	7.5	8.5
NH <sub>4</sub>	<	20ppm
NH <sub>3</sub>	<	1 ppm
Fecundidad	>	0.13

### 2.3 CONDICIONES BIOLÓGICAS DE CULTIVO

Entre los aspectos biológicos más importantes que afectan el cultivo de rotíferos está la presencia de ciliados, que provocan un aumento de los niveles de metabolitos y causan una disminución del pH; ejercen una ligera acción beneficiosa al controlar las poblaciones bacterianas, mantienen el medio con mucha transparencia y aglutinan detrito en residuos compactos; pero por otra parte compiten con los rotíferos por el alimento y como su aumento poblacional es muy rápido, desplazan a los rotíferos. Un cultivo con ciliados puede mantenerse por algunos días en explotación, pero no será de los más productivos y, al final, irremediablemente colapsa. La concentración de ciliados aumenta si la temperatura es elevada, si el sistema de cultivo es semicontinuo o si se está suministrando levadura u otro alimento artificial, por lo que en resumen, la presencia de estos organismos en el cultivo es más nociva que benéfica y puede controlarse adicionando al medio de cultivo 20 - 30 ppm de formalina un día antes de inocular los rotíferos (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001).

Otro aspecto importante para iniciar el cultivo es que el inóculo debe provenir de una población joven, con alta fertilidad. Se recomiendan inóculos provenientes de cultivos en fase exponencial y que estén presentes individuos en todos los estadios de vida, así como que se trate de un inóculo fuerte, entre 50 - 200 rotíferos/ml y en cultivos semicontinuos una concentración inicial de 10 - 50 rotíferos/ml. En un cultivo intensivo es importante que el inóculo inicial sea alto 200 individuos/ml como mínimo (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón. 2001; Sarma, *et al.* 1996).

La alimentación es uno de los aspectos fundamentales del cultivo. Los rotíferos son filtradores por excelencia y polípagos ingieren partículas pequeñas (3 -17  $\mu\text{m}$ ), aunque pueden consumir hasta 30  $\mu\text{m}$ . Los rotíferos pueden ser cultivados con una gran variedad de alimentos: bacterias, protozoos, levaduras y dietas artificiales (Sarma, 1991b), pero la práctica más común es la de utilizar cultivos de microalgas (no aceptan bien las diatomeas), según Tamaru *et al.* (1993b), cuyos resultados con el empleo de *Nannochloropsis oculata*, *N. oculata* + levadura de pan, levadura de pan, *Tetraselmis tetrathele* y *T. tetrathele* + levadura de pan no presentaron diferencias significativas en los rendimientos (141 - 160 rotíferos/ml), pero si en los perfiles de PUFA, en los cuales los rotíferos alimentados con *N. oculata* presentaron un valor nutricional superior por los niveles más elevados de ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), que son esenciales para el buen desarrollo de las larvas y del zooplancton, que reflejan la composición del alimento que ingieren (Watanabe *et al.*, 1983). Para el cultivo de rotíferos es necesario considerar las características morfológicas de la cepa, su tolerancia a las condiciones ambientales, tasa de crecimiento, rendimiento y calidad en general (Sarma y Nandini, 2005a).

La clasificación de los cultivos de rotíferos de acuerdo a la alimentación, a su duración y tipo de cosecha no puede concebirse de forma independiente, pues estos métodos y técnicas están muy relacionados por combinarse unos con otros de acuerdo a la situación, estrategia, experiencia y materiales de cada criadero. Fukusho (1989a, b) dio una visión de las técnicas de cultivo de rotíferos más aplicadas en Japón y enfocó tres aspectos fundamentales:

- a) de acuerdo al tamaño de los tanques



- b) de acuerdo al método de cosecha (cosecha total o semicontinua)
- c) de acuerdo al tipo de alimento (con *N. oculata*, con levadura de pan o ambas combinadas).

En cultivos continuos se duplica la concentración cada día, aproximadamente la mitad del cultivo se extrae diariamente y es renovado. Usando este sistema se obtiene usualmente entre 1,000 y 3,000 rotíferos/ml y los mayores valores decenas de miles por ml.

Las microalgas constituyen un buen alimento para el cultivo, son ricas en proteínas, ácidos grasos, carbohidratos y constituyen un buen suministro de vitaminas. Un problema asociado al uso de microalgas vivas como alimento para rotíferos es, que se requieren grandes volúmenes de éstas, de tal manera que su producción en términos económicos puede representar entre el 30 y 40% de los costos totales de un centro productor de juveniles (Borowitzka, 1999). Por otra parte, la calidad de las microalgas puede variar debido a factores medioambientales o cambios estacionales (Fielder, 2000).

Las microalgas verde-amarillas del género *Nannochloropsis* de la Clase Eustigmatophyceae son las que más se utilizan en la larvicultura de peces marinos y en el enriquecimiento de rotíferos, sobre todo *B. rotundiformis* (Watanabe *et al.*, 1983; Fulk y Main, 1991; Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001). La mayoría de los centros usan *N. oculata* a concentraciones entre 10 y 20 x 10<sup>6</sup> células/ml con buenos resultados por su alto valor nutricional, y son las más adecuadas para *B. rotundiformis*, que son selectivos a tamaños pequeños en el alimento (Fukusho, 1989a; Fulk y Main, 1991; Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001). Altas concentraciones de microalgas son nocivas (Sarma y Nandini, 2005b), aunque esto depende del tamaño de la especie a usar. Los cultivos donde hay una alta densidad y se forman precipitados del alga con apariencia de grumos, quedan muchos rotíferos atrapados en éstos y mueren, lo cual se aprecia con especies de microalgas de gran tamaño y tasa de sedimentación alta, como *Tetraselmis* spp. Por otra parte, las altas concentraciones de microalgas pueden elevar el pH e influir negativamente en la población al aumentar los niveles de NH<sub>3</sub>. También la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación varían al emplear diferentes densidades de una misma microalga (Watanabe *et al.*, 1983).

La microalga *N. oculata* es fácil de cultivar, pues crece muy bien en cultivos masivos, presenta una amplia tolerancia a condiciones de intemperie, tienen alta resistencia a la contaminación, cuenta con niveles altos de EPA entre las microalgas (Watanabe *et al.*, 1983; James *et al.*, 1989), se puede utilizar congelada para alimentar rotíferos (Lubzens *et al.*, 1995, 1997) y las salinidades óptimas están entre 15 y 25‰, lo que es beneficioso para los rotíferos e incluso para las larvas de muchas especies estuarinas y marinas (Watanabe *et al.* 1983).

Otras especies de microalgas de interés en la larvicultura de peces marinos son: *Isochrysis* spp. *Tetraselmis tetrathele*, *Tetraselmis chuii* y *Chaetoceros müelleri*. Las tres primeras tienen buenas cualidades para su cultivo y para la producción masiva de rotíferos (Brown *et al.*, 1997, 1998).

Los flujos productivos para los cultivos de microalgas pueden transitar hasta por cuatro etapas:

- Inóculos menores 2-15 L
- Inóculos Intermedios 100-200 L
- Inóculos mayores 0.5-3 m<sup>3</sup>
- Cultivos de producción 1-30 m<sup>3</sup>

Guillard (1975), Moretti *et al.* (1999) y Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón (2001) presentan algunas indicaciones metodológicas para el cultivo de las microalgas, entre las que se destacan las siguientes: a) el volumen del inoculo de microalga no debe ser menor al 10% del volumen total a sembrar; b) la cosecha se debe hacer durante la fase exponencial o logarítmica para que los cultivos estén en óptimas condiciones; c) como medio de cultivo para volúmenes de hasta 10 L, se recomienda el Guillard H/2 modificado; los medios de cultivo para volúmenes intermedios pueden estar basados en reactivos de calidad técnica, incluso fertilizantes agrícolas comerciales, como la urea, nitratos, superfosfatos, entre otros. lo que significa un ahorro.

El valor nutricional de los rotíferos está dado por el alimento que ingieren, por lo que la composición lipídica estará determinada por los ácidos grasos contenidos en las partículas que éstos incorporen. Los rotíferos alimentados con *N. oculata* poseen un alto valor nutricional por su alto contenido general de PUFA como de EPA en particular (Watanabe *et*

*al.*, 1983; Fukusho, 1989a, b). Debido a su habilidad de bioconvertir los rotíferos alimentados con *N. oculata* poseen valores de EPA y DHA superiores a los alimentados con levadura de pan (Watanabe *et al.*, 1983; Tamaru *et al.*, 1991, 1993b).

En algunas instituciones el cultivo de rotíferos inicia con microalgas, que se van añadiendo durante varios días hasta alcanzar el volumen y la densidad deseada para realizar la cosecha total o las cosechas parciales según el caso (Watanabe, 1982; Lee y Tamaru, 1993; Tamaru *et al.*, 1993b).

Como se ha demostrado, las microalgas son un excelente alimento para los rotíferos, pero se requiere un gran volumen de cultivo con técnicas tradicionales semi-intensivas para basar únicamente en ellas la alimentación de los rotíferos. De acuerdo a diversos reportes, las proporciones con respecto al volumen de cultivo de rotíferos han sido consideradas desde 2.5:1 hasta valores de 5 - 10:1 y por ello se comenzó a utilizar la levadura de pan como nueva fuente de alimento (Watanabe *et al.* 1983; Fukusho, 1989b).

Lo más común es el uso de *N. oculata* ( $10 - 20 \times 10^6$  células. $\text{ml}^{-1}$ ) y levadura de pan. Algunos adicionan la levadura desde el primer día, otros en los días 3° y 4° del cultivo cuando las concentraciones de microalgas disminuyen notablemente. A menudo se usa a razón de 0.5 - 1 g por millón de rotíferos y se mezcla en el momento de usarse con agua de mar. Este método permite alcanzar concentraciones de hasta 500 rotíferos/ml aproximadamente. La ración debe suministrarse dividida de 2 a 3 veces por día (Watanabe *et al.* 1983).

La adición de algas retrasa de alguna forma el proceso de descomposición, permitiendo mantener los cultivos durante un mayor período de tiempo que con la levadura. La producción de microalgas es el punto de partida para toda la cadena trófica y los sistemas de cultivo intensivo de rotíferos aunque se desarrollen con levaduras u otros alimentos, dependen de la microalga en su etapa inicial.

El valor nutricional del alimento vivo se basa determinado fundamentalmente por su composición química y está determinada en gran medida por la alimentación. Especial atención ha recibido el contenido de PUFA, sobre todo de EPA y DHA, mientras que en los últimos años también se ha estudiado el contenido de ARA, vitamina C, caroteno y otros compuestos, así como la proporción DHA:EPA.

El cultivo de rotíferos con levaduras presenta diversas ventajas, sobre todo se obtienen producciones con altas densidades a bajo costo de mantenimiento y espacio mínimo, ya que la levadura está disponible de forma estable, son fáciles de almacenar, utilizar y digerir y su precio es relativamente bajo. Para satisfacer las necesidades de alimento basadas en los grandes volúmenes de cultivo de microalgas, el gasto es muy elevado, sobre todo si se trata de países desarrollados en los que la mano de obra técnica implica salarios altos y esta actividad es eminentemente técnica; además de los salarios y otros gastos, se requiere una gran superficie y hay países como Japón donde la tierra tiene un valor muy elevado, por lo que el mantener los rotíferos a base de cultivos de microalgas es una actividad muy costosa para algunos y para otros es prohibitiva (Watanabe *et al.*, 1983; Fukusho, 1989a, b).

Según Yúfera y Pascual (1980) con el uso de bolsas de polietileno y la técnica de la levadura puede cosecharse la misma cantidad de rotíferos en 4 ó 5 días que los que pueden obtenerse en un período de 9 a 10 días con la técnica de cultivo de microalgas solamente. El costo de producción descende con el uso de levadura, pues se ahorra en el uso de nutrientes y la iluminación artificial. Los rotíferos alimentados con levadura de pan tienen déficit de PUFA y no son adecuados desde el punto de vista nutricional; ello se refleja en el desarrollo larval del organismo que se alimente con ellos y se deben enriquecer los rotíferos antes de suministrarlos a las larvas.

Debido a las deficiencias en PUFA de la levadura de pan, investigadores japoneses incluyeron aceites de hígado de calamar o pescado (15% de aceite) en el medio de cultivo de la levadura, denominándola levadura- $\omega$  (Imada *et al.*, 1979), la cual se ha utilizado para asegurar un nivel alto de PUFA en los rotíferos (Watanabe *et al.*, 1983).

Con las levaduras- $\omega$  pueden producirse satisfactoriamente los rotíferos, pero generalmente éstas se usan para enriquecimiento de ellos, pues producir los rotíferos basados en este alimento encarece el proceso; aunque según Fukusho (1989b) la introducción de levaduras- $\omega$  estimuló a desarrollar métodos en los cuales se añade la emulsión de lípidos directamente en el tanque de cría de rotíferos y los PUFA se absorben rápidamente.

Un producto comercial para el cultivo de rotíferos, el Roti-Rich® (levadura enriquecida), es mejor que la levadura de pan, pues no deteriora la calidad del agua (Guzmán, 2004). Con levadura como alimento debe tenerse en cuenta la ración diaria a suministrar; que el agua

de mar no es un medio adecuado para ellas, si se adicionan en exceso las células que no son comidas se plasmolizan y se deteriora el medio muy rápidamente, con lo cual se provoca el colapso del cultivo.

Al usar levaduras, los recipientes deben ser de fondos cónicos, pues en los planos la aireación dispersa el detrito y productos de desecho que se acumulan en el fondo. En estos casos se requiere adecuar la aireación para que esté resuspendida del fondo unos 15 - 20 cm aproximadamente.

En años recientes se han desarrollado diversas dietas formuladas, tanto confeccionadas a nivel de laboratorio como productos comerciales. Uno de los primeros productos comerciales más utilizados fue Culture Selco® (INVE Aquaculture Inc.) que es un sustituto para las microalgas que garantiza altos niveles de PUFA, vitaminas y aminoácidos (Lavens y Sorgeloos, 1996). Sus partículas de 7 µm permanecen suspendidas en el agua con una aireación relativamente fuerte y su composición química es de 45% de proteínas, 30% de carbohidratos, 15% de lípidos (33% de los cuales son PUFA (n-3)) y 7% de ceniza. Según Dhert (1996), este producto se emplea de acuerdo a la densidad de rotíferos logrando altas productividades: con inóculos de 200 rotíferos/ml, a los 4 días alcanzan unos 600 individuos/ml. El contenido PUFA: 5.4; 4.4; y 15.6 mg<sup>l</sup> de materia seca de EPA, DHA y PUFA (n-3) es significativamente mayor en los rotíferos alimentados con esta dieta, comparados con los cultivos alimentados con mezcla de microalgas y levaduras (Léger *et al.*, 1989). Por otra parte el nivel de lípidos totales (18% aproximadamente) es menos grasoso que las tradicionales emulsiones de aceite, y es comparable con el contenido del zooplancton silvestre, permitiendo un enriquecimiento directo de los rotíferos sin la necesidad de añadir compuestos nutricionales esenciales o bioencapsulación (Dhert *et al.*, 2001). El Culture Selco 3000® (INVE Aquaculture Inc.) ha sido comercializado después para alcanzar hasta 3,000 rotíferos/ml (Tabla 2) y este año dicha firma especializada se ha puesto a la venta otro producto que mejora aún más su desempeño, el Culture Selco PLUS® (Tabla 3) que se utiliza de forma similar al anterior (Tabla 2, 3), pero con densidades de siembra de 250 a 500 rotíferos/ml y con ventajas al incrementar la fertilidad, reducir el ciclo de cultivo en un día y generar menos desperdicios con las consecuentes reducciones de los flóculos y bacterias (Dr. Nick King, Solution Support, INVE Aquaculture, Inc., 2005, comunicación personal).

Por otra parte, uno de los métodos de control del cultivo, además de su densidad, es el número de huevos por hembra, como un indicador de buenas condiciones en el cultivo. Una alta producción de huevos es indicador de una alta fecundidad y por ende de un cultivo en buen estado. También el hecho de apreciarse una rápida disminución de las microalgas es una indicación de un cultivo saludable.

Tabla 2.- Alimentación con Culture Selco 3000® para el cultivo de rotíferos.

Ración de Culture Selco® 3000 Recomendada			
Día	Rotíferos/ml	g/millon	Ración diaria
0	250	0.7	175
1	340	0.55	187
2	590	0.45	265
3	850	0.35	297
4	1050		

Tabla 3.- Alimentación con Culture Selco Plus® para el cultivo de rotíferos.

Ración de Culture Selco Plus® Recomendada			
Día	Rotíferos/ml	g/millon	Ración diaria
0	250	0.7	80 + 95
1	400	0.5	200
2	700	0.4	280
3	1200		

Para la cuantificación de los rotíferos se utilizan diversas cámaras de conteo, tales como la Sedgwick-Rafter, placas con excavaciones múltiples y otros; sin embargo, Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón (2001) recomendaron el uso de una cámara poco conocida, la cámara Bógorov y la pipeta del mismo nombre (Bógorov y Zenkevich, 1947) debido a las facilidades para el conteo rápido de muestras de varios ml.

Para lograr un sistema de producción estable de rotíferos, la experiencia ha demostrado que es necesario mantener cepas de rotíferos en pequeños volúmenes y establecer cadenas de producción de inóculos cada paso con incremento de los volúmenes de cultivo, en previsión de colapsos en las cadenas de producción, por mortalidades masivas debidas a diversas causas, sobre todo en los cultivos masivos exteriores expuestos a las variaciones ambientales. Por ello, la unidad de alimento vivo debe comenzar a trabajar unos dos meses antes de la temporada de desove, estableciendo las cadenas de producción, con el fin de estabilizarlas con el flujo requerido y niveles requeridos para el ciclo de larvicultura que tiene una demanda constante de alimento vivo que dura tres o cuatro meses por cada especie a trabajar.

### 3. JUSTIFICACION

Dada la importancia que a tomado el cultivo de organismos marinos como una alternativa económicamente rentable respecto de la pesca de las poblaciones naturales, la necesidad de producir larvas de calidad con altos índices de supervivencia para su posterior engorda y que la base de toda esta cadena de sucesos es la alimentación. Un organismo bien alimentado es un organismo sano con mejores posibilidades de sobrevivir, crecer, y reproducirse, capaz de transmitir su vitalidad a través de la cadena trófica.

En la acuicultura en primer lugar esta la obtención de larvas con altos índices de supervivencia, y para lograr esto es necesario cubrir sus necesidades alimenticias en cuanto a tamaño, movimiento y valor nutricional de los alimentos, los primeros de los cuales deben ser organismos vivos, especialmente los rotíferos.

El Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán surgió con la finalidad de apoyar la solución a los problemas que atañen al sector de acuicultura y el manejo en la zona costera del noroeste del país y entre sus líneas de investigación, el área de acuicultura del laboratorio de Genética y Reproducción tiene proyectos de cultivo de larvas y juveniles de peces marinos de importancia comercial. Siendo una parte esencial de la tecnología de cría de larvas, la producción del alimento vivo, que en el caso de los peces marinos, los rotíferos constituyen el más importante (Fukusho, 1989a, b). Por lo que requiere implementar y adaptar, técnicas de cultivo masivo de alimento vivo con características que garanticen una producción de larvas de peces con alta supervivencia.

Un alimento vivo con la cantidad, calidad y en momento requerido puede lograr crías de peces exitosas aún cuando las condiciones en que se desarrolle su larvicultura no sean las mejores y por el contrario, un alimento que no cumpla los requerimientos anteriores hace que larvas provenientes de buenos reproductores y excelentes desoves, en condiciones óptimas de cría, no lleguen al final de la larvicultura o lleguen en un estado pésimo de estrés y malformaciones (Alvarez-Lajonchère y Hernández-Molejón, 2001).

Los rotíferos de la especie *Brachionus rotundiformis* son de los más adecuados para cultivar en condiciones tropicales, siendo la temperatura óptima de 28 - 35°C para crecimientos diarios del 100%, con ciclos muy cortos (Hoff y Snell, 1989). Toleran intervalos amplios de parámetros abióticos; resisten la manipulación; su cultivo masivo es



rentable y productivo; por su tamaño de entre 100 – 230  $\mu\text{m}$ . tienen buena aceptación por parte de las larvas de la mayoría de los peces marinos, además de ser fácilmente digeridos. El uso de esta especie de rotíferos en la alimentación de las larvas requiere usualmente entre 10 y 20 organismos/ml y usualmente son los indicados en los primeros días de alimentación por el tamaño de las bocas de las larvas.

Por todo lo anterior, se decidió llevar a cabo el estudio sobre la “**ADAPTACION DE TÉCNICAS DE CULTIVO INTENSIVO DEL ROTÍFERO *Brachionus rotundiformis* A ESCALA EXPERIMENTAL Y PILOTO PARA SU USO COMO PARTE DEL ALIMENTO VIVO EN ACUICULTURA**” dentro de las condiciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (**CIAD**) en Mazatlán Sinaloa.

## **4. HIPÓTESIS**

"Es posible mejorar las técnicas de cultivo intensivo del rotífero *Brachionus rotundiformis* aplicadas anteriormente en la Unidad Mazatlán del CIAD, A. C. para duplicar los rendimientos y alcanzar unos 1,000 rotíferos/ml requeridos para las producciones piloto".

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Incrementar la producción de rotíferos de la especie *Brachionus rotundiformis* hasta 1000/mL, mediante la adaptación de instalaciones, equipos y técnicas de cultivo intensivo a las condiciones del CIAD Unidad Mazatlán, para su uso como parte del alimento vivo en la acuicultura.

### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la calidad del agua y los principales parámetros ambientales mediante el correcto uso de los equipos de medición disponibles.
- Poner en marcha la infraestructura necesaria para alcanzar las densidades iniciales ( $\geq 250$  rotíferos/ml) de siembra para el cultivo intensivo de rotíferos.
- Implementar y evaluar la aplicación y aprovechamiento del oxígeno puro en sistemas de suministro y difusión en los cultivos intensivos de rotíferos.
- Determinar el mejor uso de fibra sintética en sistemas de colecta de materia orgánica para mejorar la calidad del agua en los cultivos intensivos de rotíferos.
- Evaluar el efecto que produce el uso de bombas peristálticas como alimentadores continuos en los cultivos intensivos de rotíferos.
- Comprobar la eficacia del Culture Selco PLUS® en comparación con Culture Selco 3000® en cultivo intensivo de rotíferos.
- Comprobar la eficacia del Culture Selco PLUS® en comparación con Ori-Culture® en cultivo intensivo de rotíferos.

Evaluar el beneficio de emplear un sistema de flujo continuo de agua en los cultivos intensivos de los rotíferos.

## **6. MATERIALES Y METODOS**

### **6.1 INSTALACIONES CIAD UNIDAD MAZATLÁN**

El trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones del Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo (**CIAD**) Unidad Mazatlán ubicado en la Av. Sábalo Cerritos s/n “Estero del Yugo” Apdo. Postal No. 717 C.P. 82010 en Mazatlán, Sinaloa, México, haciendo uso del Laboratorio de genética y reproducción, la planta piloto para peces marinos, así como del invernadero y taller mecánico en los que se facilitó el equipo e insumos necesarios.

#### **6.1.1 Laboratorio de genética y reproducción**

Se hizo uso del siguiente material:

##### **PARA EL CONTEO DE ROTÍFEROS**

Microscopio compuesto (Olympus CX31).

Contadores manuales (Fisher Scientific)

Cámara de conteo rallada porta objetos 1 ml

Cámaras de conteo elaboradas en el estudio (Cajas de Petri ralladas)

Vaso de precipitados 4 l

Vasos de precipitados de 100 ml

Vasos de precipitados de 500 ml

Pipetas Pasteur despuntadas

Gradilla para tubos Eppendorf

Tubos Eppendorf

Plumón indeleble

## PARA EL CONTEO DE MICROALGAS

Microscopio compuesto (Olympus CX31).

Contadores manuales (Fisher Scientific)

Cámara de Neubauer

Pipeta Pasteur despuntada

Gradilla para tubos de ensayo

Tubos de ensayo

## PARA ALIMENTACION

-Vasos de precipitados de plástico de 1 y 2 L

-Licuadora

-Culture Selco®

-Culture Selco Plus®

-Ori-Culture®

-Balanza Sartorius (capacidad Max 610g  $\pm$  0.01g)

-Matraz aforado

-Autoclave

-Agua destilada

-Superfosfato simple

-Jeringas

-Vitamina B-12

-Oligoelementos (10 ml de las soluciones A, B, C y 100 ml de la solución D, aforados a un litro, ver Tabla 4).

Tabla 4.- Soluciones madre para preparar oligoelementos recomendada por Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón (2001).

Oligoelementos		
-Solución A		
Sulfato de Zinc Crist.	Zn SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	30 gr
Sulfato Cuprico	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	25 gr
Sulfato de Cobalto	CoSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	30 gr
Sulfato Manganeso Monob	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	20 gr
Aforado a un litro		
-Solución B		
Cloruro Ferrico	FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	50 gr
Aforado a un litro		
-Solución C		
Molibdato de Sodio	NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	25 gr
Aforado a un litro		
-Solución D		
EDTA	Na <sub>2</sub> -EDTA	50 gr
Aforado a un litro		

Tabla 5.- Solución de sales recomendada por Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón (2001).

-Solución de Sales		
Nitrato de Sodio	$\text{NaNO}_3$	300 gr
Fosfato de potasio monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	30 gr
Cloruro de amonio	$\text{NH}_4\text{Cl}$	20 gr
Aforado a un litro		

#### PARA MEDIR PARAMETROS

-Termómetro de máximas y mínimas (Brannan)

-Oxímetro (WTW 315i/SET)

-Potenciómetro (la Mote pH PLUS Direct 1936)

Electrodo RIZ20

Electrodo RIY26

Vasos de precipitados de 100 ml

-Medidor de Amonio (la Mote PLUS Direct 1936)

Electrodo Amonia OAKTON BNC FF4

Vasos de precipitados de 100 y 50 ml

Probeta 50 ml

Micro pipeta Eppendorf 500  $\mu\text{l}$

Agitador magnetico (chemi-tech SP46615)

Solución NaOH 40M

Papel milimetrico semilogaritmico

Soporte para electrodos

-Refractómetro portátil

-Ortotolidina Hidrocloruro

## PARA DESINFECTAR

Tabla 6.- Formalina neutralizada.

-Formalina neutralizada 10%	
Formaldehído 37-40%	114 ml
Agua destilada	886 ml
Fosfato de sodio monobásico	4 gr
Fosfato de sodio dibásico	6 gr
Diluir los fosfatos en el agua y después incluir el formaldehído	

-Tiosulfato de Sodio

-Solución de Lugol Yodo

### 6.1.2 Área piloto

La nueva área piloto de 11 x 14 m para la producción del alimento vivo interior (Fig. 3), en la cual se encuentra el un área de 2.75 x 3 m para los experimentos (Fig. 4). Tiene un piso pulido con ligera pendiente y cuenta con canaletas de drenaje a lo largo de la instalación. En la parte superior y a lo largo de las instalaciones se encuentran las tomas de agua tanto dulce como salada (35‰), que después de pasar por un par de filtros de cartucho de 10 y

1µm de filtración relativa, convergen en una lámpara de luz UV (Fig. 14). de flujo continuo que cuenta con bombillas bactericidas (VH-9282L) de 40w de donde se utilizar el agua para todos los procesos.

Para la realización de los trabajos de la tesis, tanto en lo que se refiere a los experimentos específicos, como para la producción experimental masiva de rotíferos, se a puesto en marcha la nueva área piloto con:

- \* Tanques cilindro-cónicos de fibra de vidrio blancos con una capacidad de 100 l y de 1,200 l c/u (Fig. 5).
- \* Columnas de fibra de vidrio translúcidas de 80 l c/u (Fig. 6).
- \* Tanques cilíndricos de fibra de vidrio blancos con una capacidad de 7,000 l (Fig. 8).
- \* Garrafones de 18 l (Fig. 6).
- \* Matraces de 2 l (Fig. 7).



Fig. 3 Planta piloto de 11 x 14 m



Fig. 4, Área de cultivo de rotíferos en la planta piloto.





Fig. 5 Tanque cilindro-cónico de fibra de vidrio blanco de 1,200 l.

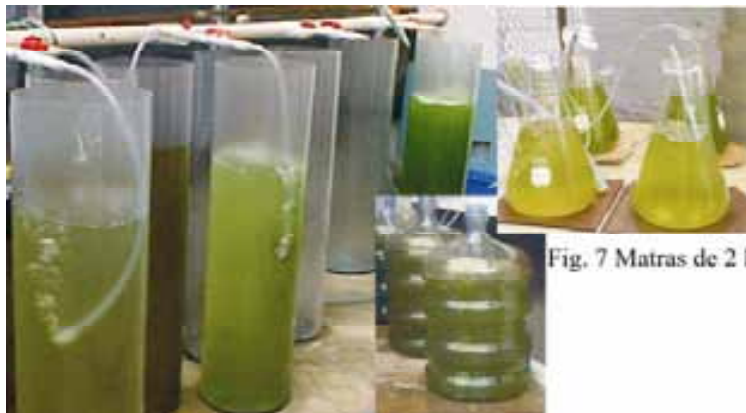


Fig. 7 Matras de 2 l

Fig. 6 Columnas de fibra de vidrio translucidas con capacidad de 80 l / Garrafones de 20 l.

Se utilizaron al final de las cadenas de producción de microalgas y rotíferos tanques de 7,000 l (Fig. 8).

Durante la etapa experimental se instalaron seis tanques cilindro-cónicos de plástico negro con una capacidad de 100 litros c/u (Fig. 9). Se utilizaron dos bombas sumergibles (Banyoles Vigila 100 MCA-SP2), una para rotíferos y la otra para microalgas.



Fig. 8 Tanque cilíndricos de 7,000 l.



Fig. 9 tanques cilindro-cónicos de 100 l.

### 6.1.3 Fuentes de Agua

El agua de mar se extrae desde la Playa Bruja a 600 m de distancia y es conducida hasta la unidad por medio de una bomba de 10 HP a través de tuberías soterradas, conectadas directamente a cuatro tanques de 25 m<sup>3</sup> cada uno, los cuales están conectados a un sistema de un filtros de arena y de cartuchos múltiples de 16 μm de retención relativa (Fig. 10). Posteriormente, el agua marina a través del sistema hidráulico de PVC, pasa filtrándose por cartuchos de 10μm; mientras que el agua dulce se encuentra en un tanque elevado de 10 m<sup>3</sup> que tiene instalada aireación constante para eliminar el cloro. Ambas tuberías se internan al sistema de filtración del área piloto (filtros de cartucho de 10 y 1 μm que convergen en una lámpara de luz UV (VH-9282L) (Fig.14). De ahí, por medio de tubería de 75 mm se abastecerán los tanques del área experimental.



Fig. 10 Tanques de cabecera de suministro y sistema de filtro de arena y cartucho.

Para reducir la salinidad de 35‰ a 25‰ se calcularon las cantidades de agua marina a 35‰ y agua dulce (0‰) para cada uno de los tanques siendo las proporciones 2.5 a 1 aproximadamente (Tabla 7).

Tabla 7.- Cantidades de agua salada y dulce para preparar agua a 25‰

<b>Para preparar agua a 25‰</b>		
Volumen de agua a preparar (l)	Volumen de agua a 35‰ (l)	Volumen de agua dulce (l)
2	1.43	0.57
15	10.71	4.29
80	57.14	22.86
100	71.43	28.57
450	321.43	128.57
1000	714.29	285.71
7000	5000	2000

#### 6.1.4 Fuentes de Aire

La red de aire existente que cuenta con tres compresores tipo soplador con capacidad de 10 HP cada uno (Fig. 11), de los cuales funciona uno para abastecer todo el sistema de la planta. La aireación suministrada a los tanques de cultivos de microalgas, es a través de mangueras flexibles de PVC transparentes de 13 mm de diámetro abiertas en el extremo (Fig. 12), en el caso de los rotíferos se utilizaron mangueras de PVC transparentes de 5 mm de diámetro interior con difusores colocados en el extremo los cuales quedaban suspendidos a unos 20 cm del fondo (Fig. 13) con un flujo moderado para evitar la remoción del sedimento. En el caso de los tanques de 1,200 l y 7,000 l, se colocaron las mangueras alejadas de las paredes para una distribución más homogénea del aire y de las partículas suspendidas.



Fig. 11 Compresores tipo soplador de 10 HP.



Fig. 12 mangueras pegadas con silicona a contrapesos para cultivos de microalga. Fig. 13 Difusores de aire colocados en el cultivo de rotíferos

### 6.1.5 Sanidad (prevención de infecciones)

Una de las vías más importantes de entrada de patógenos a los tanques de cría es la cadena del alimento vivo. Por lo anterior se utilizaron sistemas de filtración y desinfección del agua del alimento vivo para evitar la presencia de organismos patógenos.

Filtración del agua por:

- Filtros de arena (Fig. 10)
- Filtros de cartucho de 16, 10 y 1  $\mu\text{m}$ .

Desinfección con:

- Lámpara ultravioleta (VH-9282L) de flujo continuo con capacidad de radiación de  $60,000 \mu\text{W.s/cm}^2$  (Fig. 14).
- Hipoclorito de sodio comercial 6% de cloro libre, tanto para limpieza general, como para el tratamiento del agua utilizando 200 ppm veinticuatro horas antes de ser utilizada, neutralizado con 50 ppm de tiosulfato de sodio y aireación

continua por medio de mangueras de plástico corroborando la ausencia de cloro con una prueba colorimétrica utilizando Ortotolidina Hidrocloruro.



Fig. 14 Lámpara ultravioleta (VH-9282L) de flujo continuo de  $60,000 \mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ .

Como medios de prevención:

- El material de limpieza (escobas, cepillos, trapeadores, fibras, entre otros) del área es individualizado y desinfectado con hipoclorito de sodio (200 ppm).
- Para facilitar la limpieza de todos los tanques se utiliza un equipo Karcher 330 para lavado a alta presión.

Por trabajar con tanques en los que se cultivaban tanto microalgas como rotíferos el riesgo de contaminación es alto por lo que se pone especial cuidado en la limpieza al iniciar con los cultivos de microalga.

### 6.1.6 Taller y Herramientas

Para la fabricación de filtros con elevación del agua por aire (en inglés “air-lift”) (Fig 15), cosechadores (Fig. 16), e instalación de sistemas, se usó el taller y las siguientes herramientas.



Fig. 15 filtros con elevación del agua por aire (air-lift).

- |                 |                             |
|-----------------|-----------------------------|
| ➤ Segueta       | ➤ Válvulas 2”, 1½”, 1” y ½” |
| ➤ Taladro       | ➤ Válvulas para manguera de |
| ➤ Caladora      | 5mm                         |
| ➤ Desarmadores  | ➤ Pegamento PVC             |
| ➤ Hilo encerado | ➤ Pegamento de contacto     |
| ➤ Abrazaderas   | ➤ Lija                      |
|                 | ➤ Malla 40, 20, 100 µm      |

- Esmeril
- Cuchillo
- Codos pvc
- Tubo PVC 2",1", 1 ½", ¾"
- Reducciones PVC 2-1½", 2-¾", 2-½"
- Contenedores
- Manguera de 5mm, 2",1", ½", ¾"
- Piedras difusoras de aire
- Regulador de O<sub>2</sub> (Infra SH-1759)
- Compensador de O<sub>2</sub> (Key instruments 1-800 F-R)
- Cilindros de O<sub>2</sub>



Fig. 16 Cosechador de rotíferos.

## 6.2 CADENA DE PRODUCCIÓN DE MICROALGAS

Se utilizó la microalga de la especie *Nannochloropsis oculata*, para el mantenimiento y crecimiento poblacional de rotíferos, con el fin de alcanzar las densidades experimentales iniciales necesarias.

Se obtuvieron 800 ml de *N. oculata* del laboratorio de inóculos menores de alimento vivo del CIAD, procediendo a inocular 4 matraces de 2 l (Fig. 7) iniciando así la cadena de



producción que es un cultivo en serie conocido también como de desdoblamiento (Fig. 17). Para los trabajos experimentales de producción masiva, después de los tanques de 1,200 l, la cadena continuó con los tanques de 7,000 l.



Fig. 17 Cultivo en cadena o desdoblamiento.

Los matraces de 2 l (Fig. 7), una vez alcanzada una densidad de  $10 - 20 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  pasan a inocular garrafones con 15 l, luego los garrafones inoculan columnas de 80 l (Fig. 6), las columnas de 80 l inoculan columnas de 700 l y estas columnas inoculan los tanques de 7000 l (Fig. 8), partiendo de inóculos con concentraciones de  $10 - 20 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  con no menos del 10% del volumen a sembrar como se a trabajado con anterioridad (Sánchez 2006).

Previamente lavados, llenados con agua a 25% de salinidad (Tabla 7), desinfectados con hipoclorito de sodio comercial 6%, (0.5ml/l) por veinticuatro horas antes de ser utilizada, neutralizado posteriormente con tiosulfato de sodio (50mg por cada ml de cloro al 6%) y con aireación continua por medio de mangueras de plástico (Fig. 12). Antes de inocular las microalgas en fase exponencial de la cadena de producción, el agua se fertilizó con un ml/litro de agua de la solución de sales (Tabla 5) y un ml/litro de la solución de oligoelementos (Tabla 4) por los requerimientos de las microalgas referidos por Lee y Tamaru (1993b).

Como medio de cultivo para volúmenes mayores de 15 l, se utilizó la fórmula de Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón (2001), con productos de calidad técnica, incluso fertilizantes agrícolas comerciales como el nitrato y el superfosfato (Tabla 8). Los

productos se disolvieron con ayuda de una licuadora eléctrica (Braun) previamente con agua de mar.

Tabla 8.- Fertilizantes para microalgas en volúmenes mayores de 15 l (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001).

<b>Fertilizantes para microalgas</b>				
Litros de agua a fertilizar	1L	<b>80</b>	<b>450</b>	<b>1000</b>
Reactivo	mg/L	Gr	Gr	Gr
Nitrato de Amonio o Sodio	200.00	16.00	90.00	200.00
Superfosfato simple	20.00	1.60	9.00	20.00
Cloruro Ferrico	0.15	0.01	0.07	0.15
EDTA Sódico	10.00	0.80	4.50	10.00
Oligoelementos ml/l	0.25	20.00	112.50	250.00

Después de tres o cuatro días de haberse sembrado las microalgas, se tomó un mililitro de muestra con una pipeta graduada, la cual se depositó en un tubo de ensayo de donde se tomo una sub-muestra con una pipeta Pasteur y se procedió al conteo celular en una cámara de Neubauer mejorada bajo un microscopio compuesto. Se evaluó el estado general del cultivo, se verificó posibles contaminaciones, así como la concentración de las microalgas, la cual debía ser de aproximadamente  $30 \times 10^6$  células/ml, y limpia de contaminantes para considerarse en un estado optimo para el desdoblamiento o alimentación de rotíferos.

Paralelamente al cultivo de microalgas se cultivaron los rotíferos, que se mantuvieron en una cadena paralela, alimentados con la microalga *N. oculata*, a una concentración aproximada de  $30 \times 10^6$  células/ml y una temperatura ambiente.

La alimentación de los rotíferos se realizó sembrándolos en tanques que contenían la microalga. Por trabajar con tanques en los que se cultivaron tanto microalgas como rotíferos la limpieza era de especial cuidado antes de iniciar los cultivos de microalga (Fig. 17). También se alimentaron por medio de bombas sumergibles haciendo la transferencia de los tanques de microalgas a los de rotíferos con un bombeo de 20 a 40 l / min a través de malla sintética de 20  $\mu\text{m}$  para la retención de partículas. La salinidad en los cultivos se mantuvo en un rango de 20 a 25‰.

### **6.3 ORGANIGRAMA DEL USO DE LAS INSTALACIONES.**

La gran cantidad de actividades que se desprende del montaje y puesta en marcha de las cadenas de microalgas y rotíferos así como los diferentes destinos y usos que estas tienen dentro de las instalaciones, se facilita con el uso de un diagrama de flujo (Fig. 18).

### **6.4 ELABORACIÓN DE FILTROS**

Cada filtro de elevación por aire (en inglés tipo “air-lift”) se construyó de tubos de PVC, a partir de 8 cm de un tubo de 2” como eje; un tramo de 40 cm de un tubo ½” pulgada (15 mm aproximadamente) de diámetro, sostenido al centro del tubo de 2” por el material filtrante, con un tapón de PVC perforado, colocado en la parte superior de cada tubo de ½”. A través de la perforación se pasó una manguera de 5mm de diámetro que sostenía un difusor en el interior y hasta el fondo de cada uno de los tubos de ½”; (Fig. 15). Las mangueras, se conectaron al sistema de distribución de aire.

### **6.5 INSTALACIONES DE OXIGENO**

Se colocó una red de distribución con mangueras, piezas “T”, codos, tubo y válvulas de PVC, conectada a un medidor de flujo, que a su vez se encontraba conectado al regulador de los cilindros de oxígeno (Fig. 19).

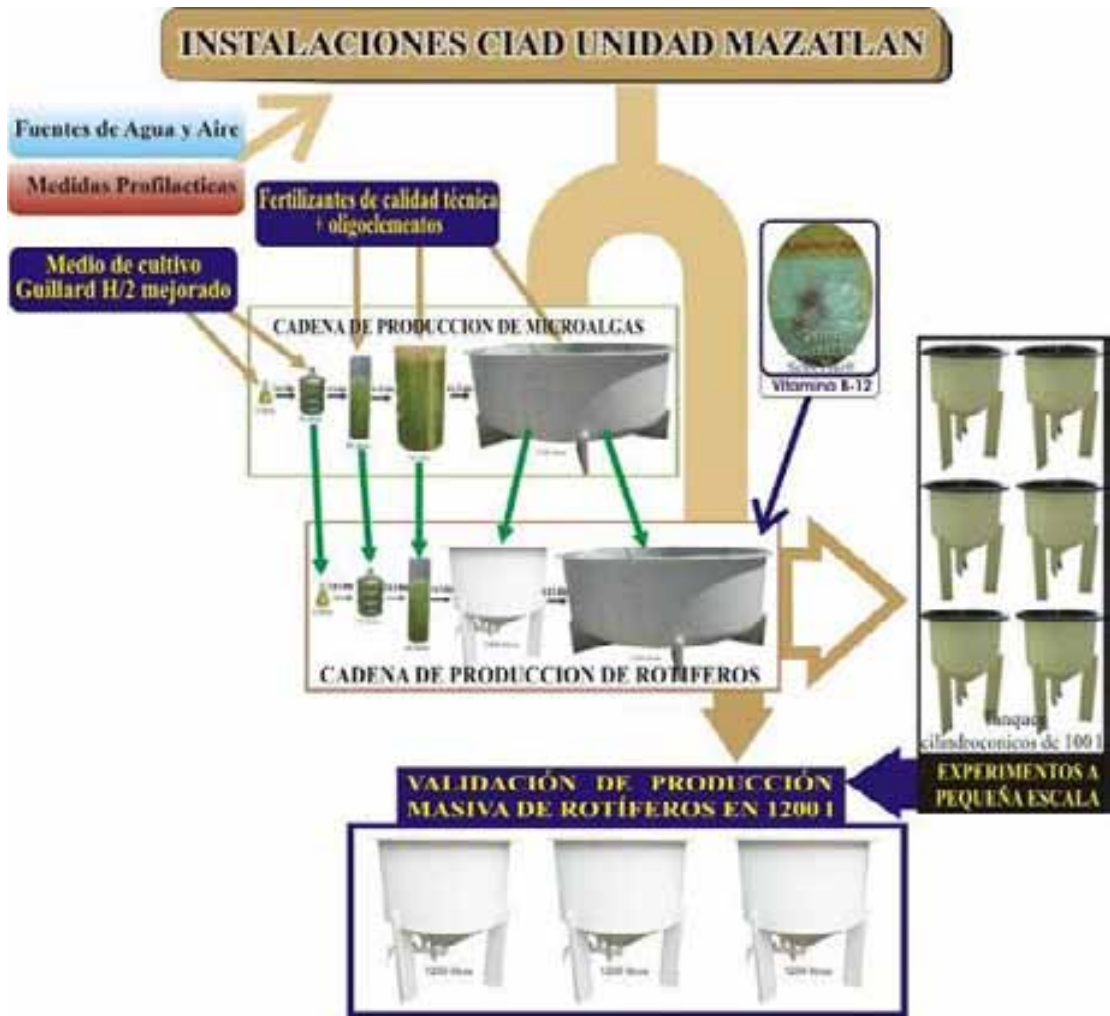


Fig. 18 Organigrama del uso de las instalaciones.



Fig. 19. Medidor de flujo conectado al regulador de los cilindros de oxígeno.

## 6.6 CADENA DE PRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS

La especie seleccionada, *Brachionus rotundiformis*, además estar presente dentro del stock del CIAD, es uno de los organismos más adecuados para ser utilizados como alimento vivo para la cría de larvas de peces marinos, puesto que cumple con características muy favorables (Hoff y Snell, 1989) explicados en el epígrafe 1.2.

De los 2 l de rotíferos de la especie *B. rotundiformis* a una densidad de 40 individuos/ml obtenidos inicialmente del laboratorio de inóculos menores del alimento vivo del CIAD, se inocularon a una densidad de  $1 \times 10^5$  rotíferos en cuatro matraces de 2 l (Fig. 7) que contenían 1 l de microalga de la especie *Nannochloropsis oculata* con aproximadamente  $30 \times 10^6$  células/ml, obteniendo una densidad inicial de 20 rotíferos/ml en cada matraz, para iniciar así la cadena de producción de rotíferos (Fig. 17).

Los matraces de 2 l se revisaron diariamente, observando el estado general del cultivo, fecundidad, ausencia de ciliados y el contenido de microalga. La densidad fue elevada a su nivel máximo con microalgas a medida que éstas fueron consumidas por los rotíferos. Una vez consumidas las microalgas y alcanzada una densidad de 50 - 70 rotíferos/ml los matraces se utilizaron para inocular garrafones con 15 l de manera directa, siguiendo el mismo procedimiento con los garrafones para inocular columnas de 80 l, con las columnas inocular tanques de 450 l y 1200 l y éstos a su vez sirvieron de inóculo a los tanques de 7000 l. A partir de las columnas de 80 l se llevó a cabo el procedimiento de cosecha.

Al inicio de la cadena de producción se filtró 200-300 ml de los rotíferos para luego añadir microalgas a los matraces y de esta manera sostener la cepa; la otra parte de los rotíferos se sembraron en los garrafones a una densidad de 10 rotíferos/ml en cada uno de ellos y fueron alimentados con las microalgas, hasta lograr una producción que se trasladó a la etapa siguiente.

La cosecha se realizó de tres formas:

1. Con bombas sumergibles plásticas con flujo de 40 l/min;
2. Con manguera conectada a la salida de drenaje del tanque con válvula de esfera en el extremo.
3. Con sifón.

Después de pasar por una malla de 100  $\mu\text{m}$  cosida en forma tubular, cerrada en uno de sus extremos y el otro atado al extremo de la manguera, el flujo fue dirigido a un colector de zooplancton preparado especialmente, que consistió de un pequeño tanque plástico con incisiones rectangulares en las paredes y el fondo cubierto de malla sintética de 40  $\mu\text{m}$  pegada con pegamento de contacto (Fig. 16). El colector se introduce dentro de un balde de 20 l perforado en las paredes permitiendo el drenado del agua, evitando la desecación de los rotíferos. Una vez cosechado el cultivo se lava con abundante agua, removiendo metabolitos, detrito, entre otros, antes de extraerse el contenido del colector, para inocular la siguiente etapa de la cadena de producción.

Los rotíferos cosechados de cultivos con contaminación de ciliados después de ser lavados, se colocaron en una solución de 15 l de formalina a 20 ppm preparada con agua de mar, filtrada hasta 1  $\mu\text{m}$  de retención absoluta y pasada por el filtro de UV de flujo continuo, en la que se dejaban de 1.5 a 2 horas, con aireación moderada ( $2 - 5 \text{ l min}^{-1}$ ) para evitar aglomeración de organismos, para posteriormente ser sembrados.

Antes de iniciar el cultivo, los tanques, las mangueras y piedras que suministraron el aire, fueron lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio comercial o ácido muriático, enjuagándolos bien, para asegurar que quedaran libres de organismos patógenos. Los tanques se lavaron inmediatamente después de cosechados, para evitar que la materia orgánica se secase en las paredes, lo que dificultaría su adecuado mantenimiento.

Los procedimientos siguientes fueron:

- las cepas de zooplancton se mantuvieron bajo las mismas condiciones que los inóculos de microalgas.
- al sembrar los nuevos cultivos se evitó tomar los sedimentos, con el fin de no introducir organismos muertos y detrito.
- al efectuar el cambio de los organismos a un volumen mayor, se seleccionaron los cultivos de mejor estado, lo cual se verificó previamente con observaciones bajo el microscopio: buena motilidad, presencia de organismos con huevos y que en la población estuvieran representados individuos de todas las edades.

Para la cadena de rotíferos con vistas a los experimentos en los tanques de 100 l, se utilizaron dos tanques de fibra de vidrio de 7,000 l (Fig. 8) con el interior blanco pulido en los que se cosecharon inóculos intermedios de 150 l. Estos tanques resultaron muy importantes para alcanzar las densidades iniciales para los experimentos de cultivo intensivo. La forma y acabado de estos tanques permitió hacer una buena limpieza.

La alimentación se realizó a partir de la cadena de microalgas, con una concentración de 10 a  $30 \times 10^6$  células/ml, que paralelamente estaba en funcionamiento. Se colectaron las microalgas de los tanques de volúmenes más altos que tenían las densidades celulares suficientes. El traslado fue por medio de bombas sumergibles desde los tanques de microalgas a los de rotíferos, con un bombeo de 20 a 40 l /min a través de malla sintética de 20  $\mu$ m para la retención de partículas.

Durante los experimentos desarrollados en los tanques de 100 l, los rotíferos fueron alimentados únicamente con alimentos artificiales como Culture Selco 3000®, Selco Plus® y Ori-Culture® a razón de 0.7-0.4 g/millón de rotíferos, dependiendo del alimento y del día de cultivo, durante cinco días, repartiendo la ración diaria en tres porciones hasta probar la eficacia de las bombas peristálticas como alimentadores continuos.

Posterior a la primera alimentación, todos los días fue de 8 g. Del alimento artificial correspondiente, se procedió a tomar los parámetros físico-químicos y hacer los conteos. Después de los primeros conteos se preparó el resto del alimento en vasos de precipitados de 1 l con agua a 25‰, mezclado con una licuadora y se repartió en dos raciones a lo largo del resto del día.

## **6.7 CONTEO DE ROTÍFEROS**

La cuantificación de los cultivos de rotíferos se realizó mediante el Método directo con una pipeta graduada y despuntada

- Se tomaron de los tanques experimentales cinco muestras de 110 ml con un vaso de precipitado de 100 y se unieron en un vaso de precipitado de 500 ml (550 ml).

- Se aforó la muestra a un volumen de 2.750 litros (agregando 4 volúmenes), tomando de aquí las sub-muestras de 1 ml a analizar.
- Se tomaron tres sub-muestras de 1 ml con una pipeta graduada y despuntada, burbujeando previamente el líquido (Fig. 20).
- Las muestras se depositaron en tubos Eppendorf.
- La muestra se colocó en una cámara de conteos (Fig. 20) para su observación al microscopio.
- Se realizaron observaciones del estado general de los organismos: si se han alimentado, la motilidad y el número de huevos por hembra.
- Se adicionaron unas gotas de solución Lugol.
- Se realizó un conteo bajo el microscopio (Olympus CX31) con auxilio de un contador manual.
- Se registraron los conteos.
- Por último, se promediaron los conteos para obtener la concentración de rotíferos. $\text{ml}^{-1}$  del cultivo.



Fig. 20 Pipeta despuntada y cámara de conteo.



Fig. 21 Bombas peristálticas.



## 6.8 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

Diariamente después de la primera dosis de alimento, se efectuaron sistemáticamente las determinaciones de los parámetros físicos, químicos y biológicos que deben controlarse para prevenir el colapso de los cultivos:

- pH
- oxígeno
- temperatura
- salinidad
- concentración de alimento
- concentración de amonio no ionizado ( $\text{NH}_3$ )
- abundancia de ciliados

De cada tanque experimental se tomaron muestras de 100 ml de agua a través de malla de  $40\mu\text{m}$  para evitar extraer rotíferos. En el laboratorio se determinó el pH y el amonio no ionizado, mediante el equipo pH PLUSDIRECT Meter (La Motte), con sus respectivos electrodos. En el caso del amonio se tomó una submuestra de 50 ml a la cual se agregó  $500\mu\text{l}$  de NaOH 4 mol y se tomó la lectura sobre un agitador magnético. La lectura, en milivolteos, se extrapoló sobre una curva de calibración hecha en papel milimétrico/semi-logarítmico a partir de soluciones a 10, 100 y 1000 ppm de  $\text{NH}_4$ , según el método recomendado por el fabricante del equipo, previamente se corroboró que las especies químicas presentes en el agua salada no afectarían la lectura esto se realizó tomando las lecturas de las soluciones de calibración 10, 100 y 1000 ppm de  $\text{NH}_4$  preparadas tanto en agua dulce 0‰ como en agua marina 35‰ verificando que no existían diferencias significativas una vez hechos los análisis de estadísticos de varianza de dos vías y la prueba de Tukey. El oxígeno, la temperatura y la salinidad, se tomaron in situ con los respectivos aparatos.

La concentración de alimento, la actividad natatoria y la abundancia de ciliados, se evaluaron previo y durante el conteo de los cultivos.

## **6.9 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS TRABAJOS A PEQUEÑA ESCALA**

### **6.9.1 Diseño**

Se realizaron siete experimentos, cada uno con dos tratamientos y cada tratamiento con tres réplicas que se trabajaron simultáneamente. Se utilizaron seis tanques cilindro-cónicos de fibra de vidrio negros (con un diámetro de 53 cm y una altura de 87cm) con una capacidad de 100 litros. El inóculo inicial de rotíferos se obtuvo de una columna homogénea de 80 l. Los tanques etiquetados como T1, T2, T3, T4, T5, T6 fueron las unidades experimentales a las que en cada uno de los experimentos se aplicó un tratamiento con una variable por triplicado y un tratamiento control. Las unidades (tanques), se seleccionaron aleatoriamente con una tabla de números aleatorios (diseño completamente aleatorizado) y se ajustaron las condiciones a controlar como: salinidad, concentración, filtros y oxígeno en cada experimento.

### **6.9.2 Preparación de los inóculos**

Para poder obtener las densidades iniciales de los experimentos, que fueron de  $\geq 250$  rotíferos/ml, se consideró un 10% de pérdida de organismos durante la cosecha por pruebas preliminares, se estableció el sistema de cadenas de producción tanto de rotíferos como de microalgas previo al montaje de los experimentos.

La alimentación de los rotíferos previa a los experimentos se hizo de dos formas:

1. Sembrando los rotíferos cosechados, en tanques que contenían microalgas (Fig. 8).
2. Por medio de bombas sumergibles haciendo la transferencia de los tanques de microalga a los de rotíferos con un bombeo de 20 a 40 l /mín. a través de malla sintética de 20  $\mu\text{m}$ . para la retención de partículas.

Todos los días se tomaron las alicotas se aforaron y con una pipeta despuntada se colocaron las muestras en tubos Eppendorf marcados, que se trasladaron al laboratorio en donde se realizaron observaciones del estado general de los organismos: la motilidad, el número de huevos por hembra, la cantidad de hembras grávidas y el número total de hembras. Se

agregaron unas gotas de solución Lugol y se contaron bajo el microscopio con auxilio de un contador manual. Los conteos se promediaron conociendo entonces la concentración de rotíferos/ml del cultivo.

Cuando la suma de las densidades de los tanques estuvo cercana a los  $250 \times 10^6$  de rotíferos se agregaron 0.002 mg de vitamina B-12 por mililitro de agua para aumentar la fecundidad. El día siguiente después de contar y asegurar que existía la cantidad con la fecundidad adecuada para poder montar el experimento, se procedió a cosechar concentrando todo en una columna de 80 l con un volumen de 60 l (con la finalidad de utilizar 10 l por tanque), con aireación, con agua filtrada hasta 1  $\mu\text{m}$ . de retención absoluta, pasada por la lámpara de UV de flujo continuo (Fig. 14) y formalina a 20 ppm para eliminar ciliados no deseados. Después de una hora se procedió a sembrar los rotíferos en los tanques experimentales previamente montados con el tratamiento deseado, tratando que la siembra fuese lo mas homogénea posible; en el experimento de validación en tanques de 1.2 m<sup>3</sup> se realizo la preparación del inóculo de igual manera con la diferencia que se partió de una densidad cercana a los  $10 \times 10^7$  rotíferos concentrados una columna de 80 l de la que se tomaron 20 l hasta completar la siembra.

### **6.9.3 Plan de trabajo**

Se consideró el día de montaje como día cero y con el fin de poder realizar de manera correcta y ordenada las actividades, fue necesario establecer un cronograma que se siguió durante el desarrollo de los experimentos (Tabla 9).

Tabla 9.- Cronograma de actividades durante los experimentos.

<b>CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b>	
HORA	ACTIVIDAD
9:00	Detener aireación
9:00-9:15	Preparar 8 g. de alimento artificial por tanque.
9:15	Descarga del sedimento del fondo (purga).
9:15-9:45	Cambio de filtros*
9:45	Administrar alimento 8 g.
10:00-10:30	Toma de muestras.
10:30-11:00	Toma de temperatura, O <sub>2</sub> y salinidad.
11:30-12:00	Ajuste de Salinidad (en caso necesario)*
12:00-12:30	Conteo de un tanque por tratamiento (rotíferos/ml).*
12:30-13:00	Preparar alimento de acuerdo al conteo y ración, sin olvidar los 8 g ya suministrados.*
14:00	Administrar 2da ración de alimento.*
13:00-14:00	Revisión del estado general de todas las unidades experimentales.
14:00-15:00	Aplicar tratamientos en caso de ser necesarios (formalina).*
15:00-16:30	Procesamiento de muestras para pH y amonio.
16:30-19:00	Continuar y terminar el conteo de todas las unidades experimentales.
19:00-20:00	Captura de datos en el sistema computarizado de registro establecido al efecto.
19:00	Administra 3a y ultima ración de alimento*

\* Excluido el ultimo día.

Los rotíferos contenidos en estas unidades fueron alimentados diariamente con la dieta de alimento artificial respectiva según densidades de rotíferos (Tabla 10).

Tabla 10.- Alimentación suministrada de alimento artificial.

Alimentación de rotíferos			
día	g de alimento Artificial / millón de rotíferos		
	Culture Selco 3000®	Culture Selco Plus®	Ori-Culture®
0	0.7	0.7	0.4
1	0.55	0.5	0.4
2	0.45	0.4	0.4
3	0.35	0.4	0.4
4	0.35	0.4	0.4
5	0	0	0

El último día experimental los rotíferos se cosecharon, se cuantificaron y utilizaron para la alimentación de larvas del pargo *Lutjanus guttatus* y del botete diana *Sphoeroides annulatus* en etapa de desarrollo zooplanctónica.

## 6.9.4 Descripción de los experimentos

### 6.9.4.1 Experimento 1: Uso de oxígeno puro

El Experimento No. 1 se probó el uso de oxígeno puro, recomendado por muchos autores en la literatura citados por Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón (2001) y por la firma INVE Aquaculture, Inc. productora del alimento a utilizar (Culture Selco 3000® y Culture Selco Plus®) a una salinidad de 25‰, con el objetivo de comprobar su eficacia en el cultivo intensivo de rotíferos de la especie *B. rotundiformis* en las condiciones del CIAD Mazatlán. La densidad de siembra fue de  $477 \pm 20$  rotíferos/ml.

Los tanques seleccionados de manera por tratamiento fueron:

- Tratamiento 1 (con oxígeno puro): tanques 1, 2 y 5.
- Tratamiento 2 (con aireación): tanques 3, 4 y 6.

El oxígeno se aplicó de manera permanente. a una presión de 12 psi, manteniendo el oxígeno en un rango aceptable para el cultivo.

#### **6.9.4.2 Experimento 2: filtros para la colecta de materia orgánica (Fibra “Scotch Bright”)**

En el experimento 2 se probó la Fibra “Scotch Bright” como colectores de materia orgánica con una densidad de siembra  $370 \pm 60$  rotíferos/ml con el objetivo de comprobar su eficacia en el cultivo intensivo de rotíferos bajo las condiciones del CIAD Mazatlán, a una salinidad de 25‰.

Los tanques seleccionados de manera por tratamiento fueron:

- Tratamiento 1 (con Fibra “Scotch Bright”): tanques 1, 4 y 5.
- Tratamiento 2 (sin Fibra “Scotch Bright”): tanques 2, 3 y 6.

Se utilizó una columna de 80 l a un volumen de 60 l previamente homogénea, procedente de la cosecha de la cadena de rotíferos, todo a 25‰.

#### **6.9.4.3 Experimento 3: Uso de sistema filtros para la colecta de materia orgánica**

Con este experimento se probó el uso de filtros de tipo “air-lift” (Fig. 15) con fibra tipo esponja, que fue cambiada por fibra limpia y desinfectada a diario, como sistema de colecta de materia orgánica y para el incremento adicional de oxígeno al agua. La densidad de siembra fue de  $251 \pm 40$  rotíferos/ml.

Los tanques seleccionados de manera por tratamiento fueron:

- Tratamiento 1 (con filtro): tanques 1, 4 y 6.
- Tratamiento 2 (sin filtro): tanques 2, 3 y 5.

Los filtros “air-lift” (Fig. 15) fueron instalados con ayuda de alambre sujeto a la pared del tanque, esto permitió mantener los filtros en posición vertical.

#### **6.9.4.4 Experimento 4: Uso de bombas peristálticas (alimentación continua)**

En este experimento se probó el uso de bombas peristálticas como alimentadores continuos (Fig. 21) para una aplicación racional del alimento.

Los tanques seleccionados de manera por tratamiento fueron:

- Tratamiento 1 (con alimentador): tanques 1, 4 y 6.
- Tratamiento 2 (sin alimentador): tanques 2, 3 y 5.

Las bombas peristálticas fueron instaladas con ayuda de una tabla de madera que se colocó sobre los tanques, lo que permitió mantener en equilibrio las bombas. La densidad de siembra fue de  $418 \pm 25$  rotíferos/ml.

#### **6.9.4.5 Experimento 5: Alimento (Selco 3000®-Selco Plus®)**

El Experimento No. 5 se probaron los alimentos Selco Plus®, contra Selco 3000® recomendados y fabricados por la firma INVE Aquaculture, Inc. a una salinidad de 25‰, con el objetivo de comprobar su eficacia en el cultivo intensivo de rotíferos de la especie *B. rotundiformis*. La densidad de siembra fue de  $222 \pm 12$  rotíferos/ml.

Los tanques seleccionados de manera por tratamiento fueron:

- Tratamiento 1 (Selco Plus®): tanques 1,2 y 4.
- Tratamiento 2 (Selco 3000®): tanques 3, 5 y 6.

El oxígeno se aplicó de manera permanente. a una presión de 12 psi, manteniendo el oxígeno en un rango aceptable para el cultivo.

#### **6.9.4.6 Experimento 6: Alimento (Selco Plus®- Ori-Culture®)**

En el Experimento No. 6 se probaron los alimentos Selco Plus®, contra Ori-Culture® recomendado por el Dr. Nick King por no requerir el uso de O<sub>2</sub> puro. La densidad de siembra fue de  $265 \pm 24$  rotíferos/ml.

Los tanques seleccionados de manera por tratamiento fueron:

- Tratamiento 1 (Selco Plus®): tanques 1, 4 y 5.
- Tratamiento 2 (Ori-Culture®): tanques 2, 3 y 6.

El oxígeno se aplicó de manera permanente al tratamiento 1, mientras que el tratamiento 2 únicamente recibió aireación.

#### **6.9.4.7 Experimento 7: Flujo continuo de agua**

En este experimento se probó el flujo continuo de agua con la instalación de filtros (Fig. 22) para evitar la salida de los rotíferos por el sistema. La densidad de siembra fue de  $251 \pm 43$  rotíferos/ml.

Los tanques seleccionados de manera por tratamiento fueron:

- Tratamiento 1 (con alimentador) : tanques 1, 3 y 5.
- Tratamiento 2 (sin alimentador) : tanques 2, 4 y 6.

Las bombas peristálticas fueron instaladas con ayuda de una tabla de madera que se colocó sobre los tanques, lo que permitió mantener en equilibrio las bombas.



Fig. 22 Sistema de filtrado para flujo continuo.



## 6.10 EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN 1.2 m<sup>3</sup>

Se realizó una experiencia de producción masiva de rotíferos aplicando los mejores resultados de las técnicas de cada uno de los experimentos, basada en una alimentación con Culture Selco Plus®, circulación abierta, O<sub>2</sub> puro y filtros, en tanques cilindro-cónicos de 1200 l (Fig. 5), logrando incrementar las producciones de rotíferos que habitualmente se estaba obteniendo en la unidad de alimento vivo del CIAD. Para este experimento se prepararon las cadenas de producción de la microalga y de los rotíferos en los tanques de 1,200 l y 7,000 l, logrando una producción de 100 millones de rotíferos que aseguraron la siembra inicial de  $\geq 250$  rotíferos/ml en tres tanques de 1200 l.

## 6.11 REGISTRO DE DATOS

Diariamente se realizaron los registros de la temperatura, oxígeno disuelto, pH, amonio no ionizado, salinidad y las observaciones de la concentración de alimento, actividad natatoria y abundancia de ciliados. El conteo de cada una de las unidades experimentales de rotíferos se realizó por triplicado, registrando el número de rotíferos, rotíferos con huevos y huevos por mililitro. Con estos datos se estimó el crecimiento poblacional, el porcentaje de huevos y la fecundidad. Todos estos datos se escribieron en un sistema de registro preparado para estos efectos (Tabla 11).

En el control del cultivo se aplicaron diversos índices para evaluar el estado del mismo y para detectar signos de alerta:

- La tasa de reproducción: normalmente  $> 30\%$  de los rotíferos deben llevar huevos 24 h después de la iniciar el cultivo (Tamaru *et al.*, 1993a)
- El índice de fecundidad. Es el número de huevos portados dividido entre el número de hembras.
  - ❖ En fase exponencial el cultivo tiene promedios entre 0.5 - 1.2 huevos por hembra.
  - ❖ En fase estacionaria (cuando hay un equilibrio que no crece ni decrece) está entre 0.13 y 0.5.
  - ❖ Un promedio inferior a 0.13 indica que la población está en declinación.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 CALIBRACION DEL ELECTRODO DE AMONIO

Previo al montaje de los experimentos en el laboratorio se realizaron dos curvas de calibración de amonio a partir de soluciones a 10, 100 y 1000 ppm de  $\text{NH}_4$ , en agua salada y otra con agua dulce. Para corroborar el correcto funcionamiento del electrodo de amonio con agua salobre. El amonio no ionizado, se determino mediante el equipo pH PLUSDIRECT Meter (la Mote pH PLUS Direct 1936), con su respectivo electrodo (OAKTON BNC FF4). Tomando una submuestra de 50 ml a la cual se agregaron 500 $\mu\text{l}$  de NaOH 4 mol, tomando las lecturas sobre un agitador magnético (chemi-tech SP46615).

El análisis de varianza aplicado mostró que las diferencias no eran significativas ( $P = 0.860$ ), después de demostrar que los datos obtenidos con ambos stock eran normales y homosedásticos (Fig. 23). Comprobando así que las especies químicas presentes en el agua marina no afectan en la determinación del amonio por medio del equipo pH PLUSDIRECT Meter (la Mote pH PLUS Direct 1936).

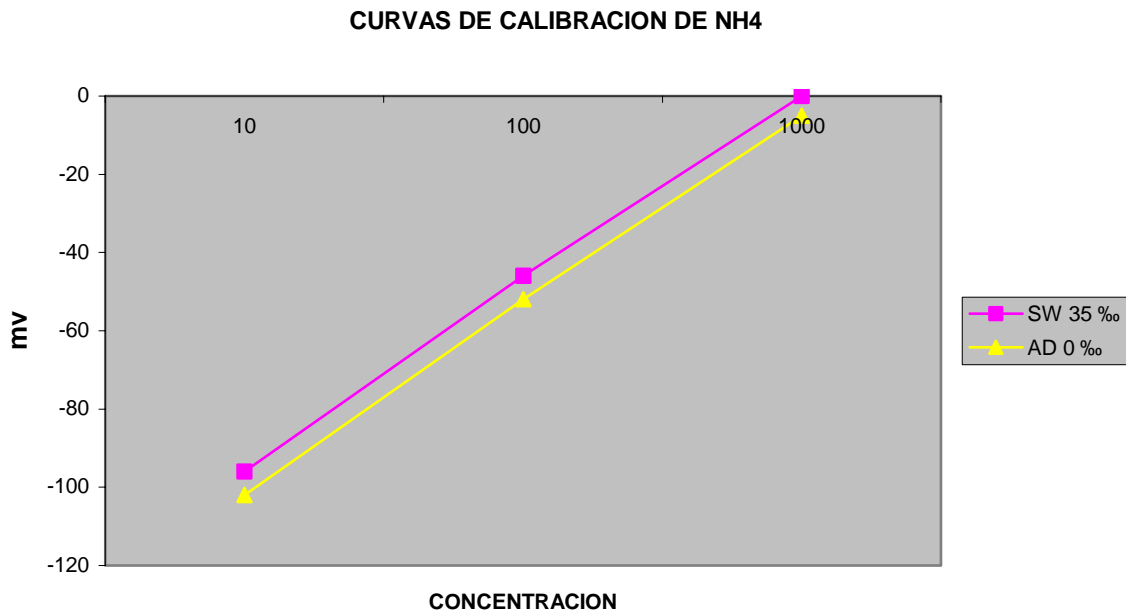


Fig. 23.- Curva comparativa de calibración de amonio.

## **7.2 CADENA DE PRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS**

Se montó la cadena de producción de los rotíferos (Fig. 17), en la cual se confrontaron frecuentes dificultades, especialmente por contaminaciones bacterianas y de ciliados, por lo cual se requirió tomar medidas especiales. Paralelamente al cultivo de los rotíferos, se mantuvo una cadena de producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* que sirvió para la alimentación de la cadena de producción de rotíferos.

### **7.2.1 Trabajos de limpieza y desinfección fundamentales acometidos:**

- Cabe mencionar que las necesidades del CIAD en cuanto a instalaciones y calidad de agua, han cambiado con la puesta en marcha e inauguración en el 2007 de la nueva área piloto.
- Uso de una lámpara de luz ultravioleta (VH-9282L) de flujo continuo con capacidad de radiación de  $60,000 \mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$  (Fig. 14)
- El agua es pasada por una serie de filtros de arena y de cartuchos múltiples de  $16 \mu\text{m}$  de retención relativa (Fig. 10). Posteriormente, el agua a través del sistema hidráulico de PVC, pasa filtrándose por cartuchos de  $10 \mu\text{m}$ .
- Tratamiento del agua a utilizar con hipoclorito de sodio comercial (6% de cloro libre) veinticuatro horas antes de ser utilizada, neutralizado posteriormente con tiosulfato de sodio según las técnicas establecidas (Moretti et al., 1999).
- El material de limpieza (escobas, cepillos, trapeadores, fibras, entre otros) del área es individualizado y desinfectado con hipoclorito de sodio (200 ppm).
- Los cultivos de rotíferos que presentaron contaminación se trataron de diversas formas, con lavados con agua filtrada y tratada con luz ultravioleta (Fig. 14) y a su vez con hipoclorito de sodio – tiosulfato de sodio.

### **7.2.2 Alimentación de los cultivos de rotíferos:**

La alimentación de rotíferos con microalgas se realizó de dos formas que resultaron efectivas:

1°- Sembrando >10 rotíferos/ml en tanques que contenían microalgas a densidades de  $10\text{-}30 \times 10^6$  células/ml.

2°- Transportando la microalga a través de bombas sumergibles a los tanques con rotíferos.

En el primer caso los rotíferos se cosecharon y lavaron, operación que llevó más tiempo, pero en el segundo caso, se requirió que los tanques tuvieran el espacio suficiente para agregar los volúmenes necesarios de microalgas, que por lo general son altos.

### 7.2.3 Estado del cultivo de los rotíferos

Además de la densidad del cultivo y los niveles bajos de bacterias y protozoos, se utilizaron otras medidas de control para conocer el estado de los cultivos de rotíferos: el número de huevos que portaban las hembras y la conducta de locomoción. En el primer caso, la observación de hembras con dos o más huevos es indicativo de un cultivo en buen estado; sin embargo, se realizó aplicación de la vitamina B-12 (0.002 mg/ml de cultivo), medida que resultó muy efectiva para lograr una alta fecundidad y hasta 5 huevos por hembra (Fig. 24) a las 24 h. En el segundo caso, si la natación tiene una apariencia perezosa en comparación con un cultivo saludable, es probable que haya un estrés fisiológico que producirá una disminución en la fecundidad.



Fig. 24 Rotífero con gran cantidad de huevos.

## 7.3 EXPERIMENTOS

### 7.3.1 Experimento 1: Uso de oxígeno puro

A partir de una siembra inicial de  $477 \pm 20$  rotíferos/ml, la densidad rotíferos obtuvo los mayores niveles en los tanques del tratamiento con oxígeno  $1354 \pm 361$  rotíferos/ml, mientras que en los tanques sin oxígeno  $451 \pm 288$  rotíferos/ml (sin tomar en cuenta uno de los tanques que dio cero el último día) (Fig.25). El comportamiento de las replicas fue similar en cada uno de los dos tratamientos. El análisis de varianza ( $P = 0.347$ ) indicó que la diferencia fue estadísticamente significativa ( $P = 0.024$ ), existiendo una interacción entre la densidad de rotíferos y el uso de oxígeno puro a lo largo del día.

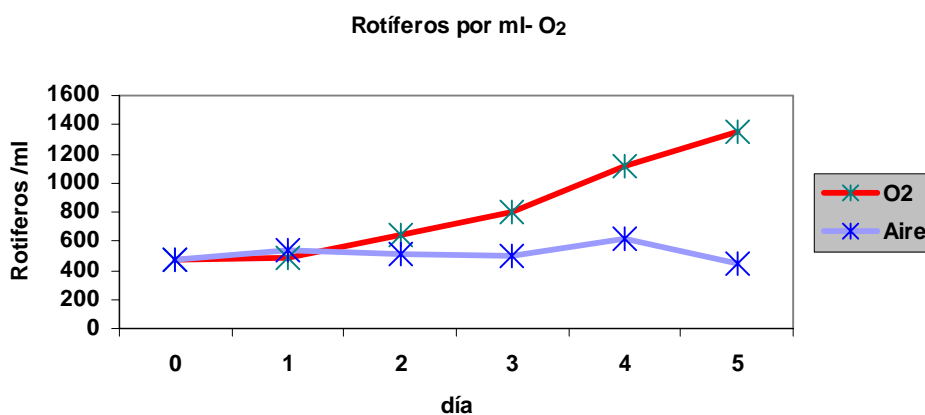


Fig. 25.- Densidad de rotíferos durante el experimento del uso de oxígeno puro.

En el índice de fecundidad y el porcentaje de hembras con huevos se apreció un comportamiento similar (Fig. 26), el análisis de varianza indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas en la fecundidad ( $P = 0.883$ ) ni tampoco en el porcentaje de hembras con huevo ( $P = 0.973$ ) por el uso de oxígeno puro, teniendo que en el último día en los tanques con el tratamiento de aire empezaron a morir los rotíferos de forma masiva.

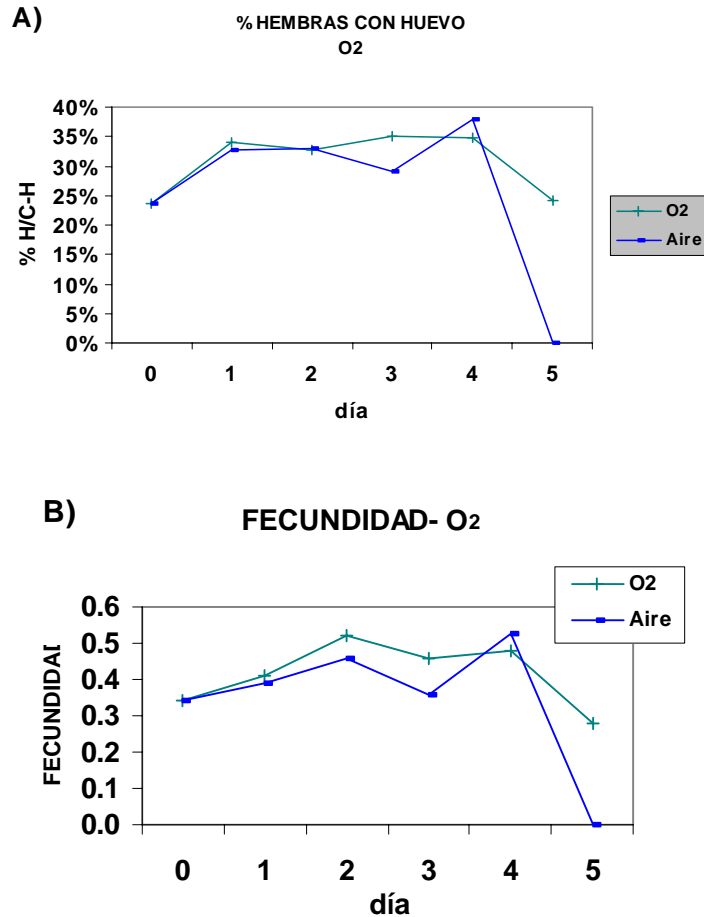


Fig. 26.- A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de oxígeno puro.

El segundo día se detectó un incremento importante en el amonio no ionizado a niveles de riesgo para los cultivos masivos de rotíferos en los tanques con aireación, nivel que se sobrepasó en el tercer día (Fig. 27). El análisis estadístico de varianza ( $P = 1.000$ ) indicó que la diferencia era estadísticamente significativa ( $P = <0.001$ ) por efectos del tratamiento a lo largo de los días ( $P = 0.004$ ). En el tratamiento con oxígeno, las concentraciones de amonio no ionizado durante todo el experimento fueron marcadamente menores y nunca sobrepasaron el nivel aceptable para el cultivo de rotíferos.

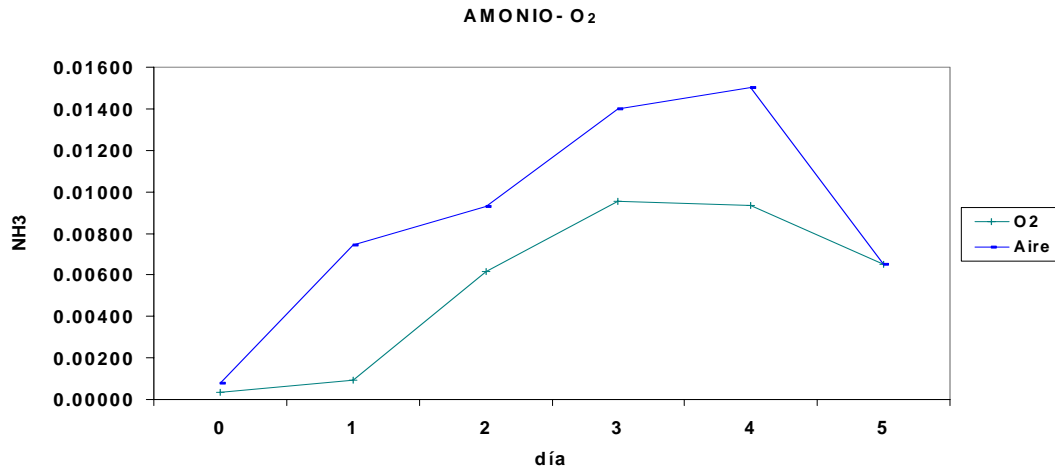


Fig. 27.- Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de oxígeno puro.

El tratamiento de oxígeno puro se mantuvo dentro del intervalo adecuado de oxígeno (10-15 ppm) mientras que los tanques con aireación a partir del segundo día sobrepasaron el nivel mínimo aceptable para el cultivo de rotíferos (5-7 ppm) Fig. 28, cuya diferencia fue estadísticamente significativa ( $P = 0.293$ ).

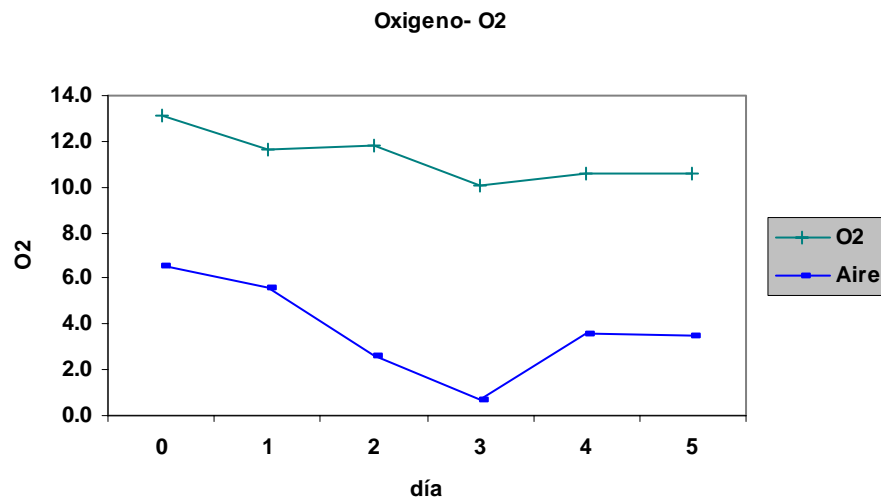


Fig. 28.- Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de oxígeno puro.



El pH en los tratamientos con y sin uso de oxígeno puro presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.646$ ), con valores en el tratamiento con oxígeno puro ( $8.00 \pm .37$ ) en comparación al tratamiento con aire ( $8.00 \pm 0.25$ ) y en ambos se mantuvo cerca de los límites máximos del intervalo óptimo 7.5 - 8.5 (Tabla 1) durante los días del cultivo (Fig. 29).

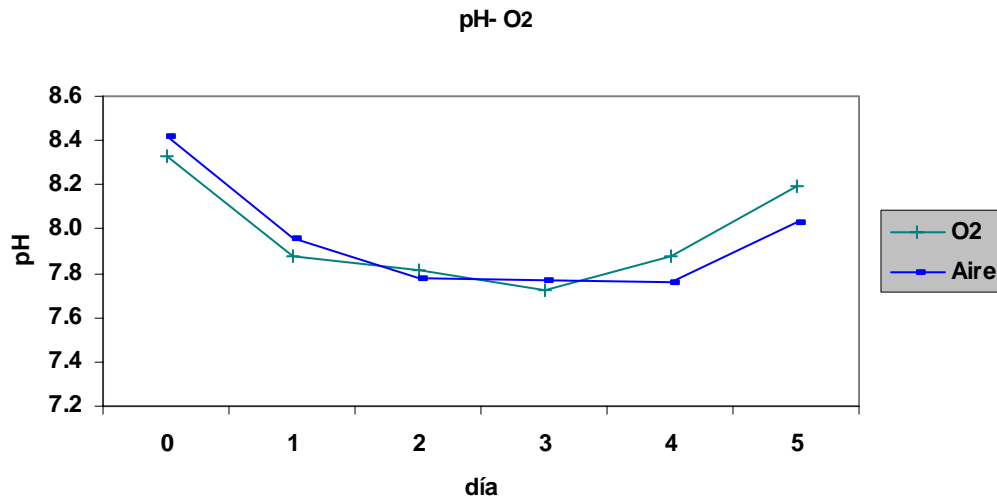


Fig. 29.- Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de oxígeno puro.

La temperatura se mantuvo estable, con máximas de  $26.5 \pm 1.5$  y mínimas de  $24 \pm 1$  durante los días de cultivo (Fig. 30).

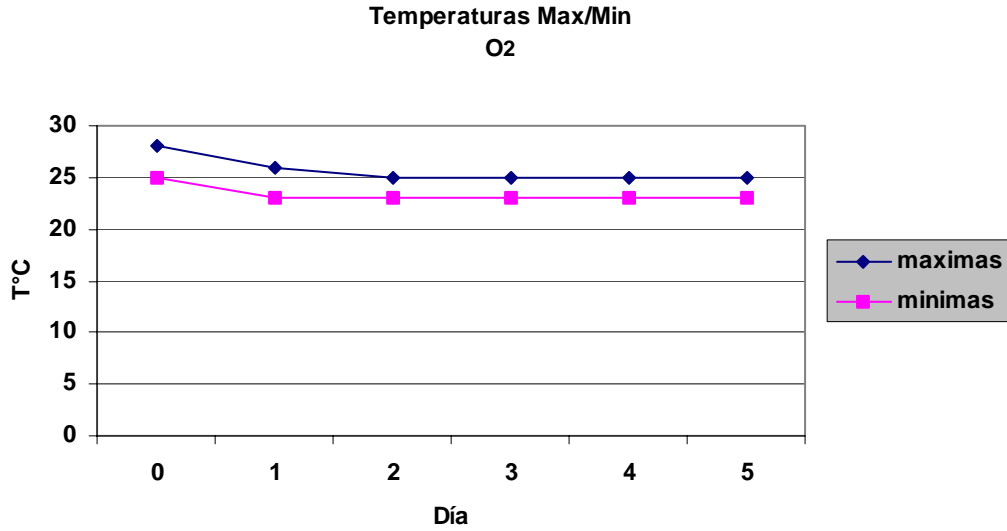


Fig. 30.- Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de oxígeno puro.

La tasa de crecimiento fue de  $0.21 \pm 0.05$  en el tratamiento con oxígeno puro y 0.12 hasta 0.00 para el tratamiento con aire (Fig. 31), lo cual indicó que el uso de oxígeno puro influye positivamente en el crecimiento de la población.

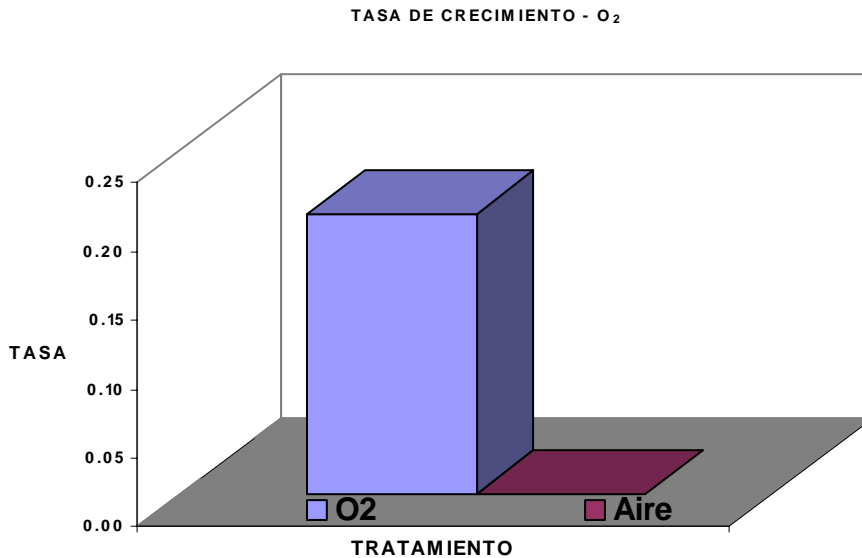


Fig. 31.- Tasa de crecimiento (K) en cada uno de los tanques en el experimento de uso de oxígeno puro.

### 7.3.2 Experimento 2: filtros para la colecta de materia orgánica (Fibra “Scotch Bright”).

A partir de una siembra inicial de  $370 \pm 60$  rotíferos/ml, el tratamiento con filtro (Fibra “Scotch Bright”) fue el que obtuvo los mayores niveles  $763 \pm 150$  rotíferos/ml (sin filtro  $670 \pm 40$  rotíferos/ml) (Fig. 32). El comportamiento de las replicas fue similar en cada uno de los dos tratamientos. La prueba de normalidad al igual que el análisis de varianza indican que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.059$ ), no existiendo una interacción entre la densidad de rotíferos y el uso de filtros (Fibra “Scotch Bright”).

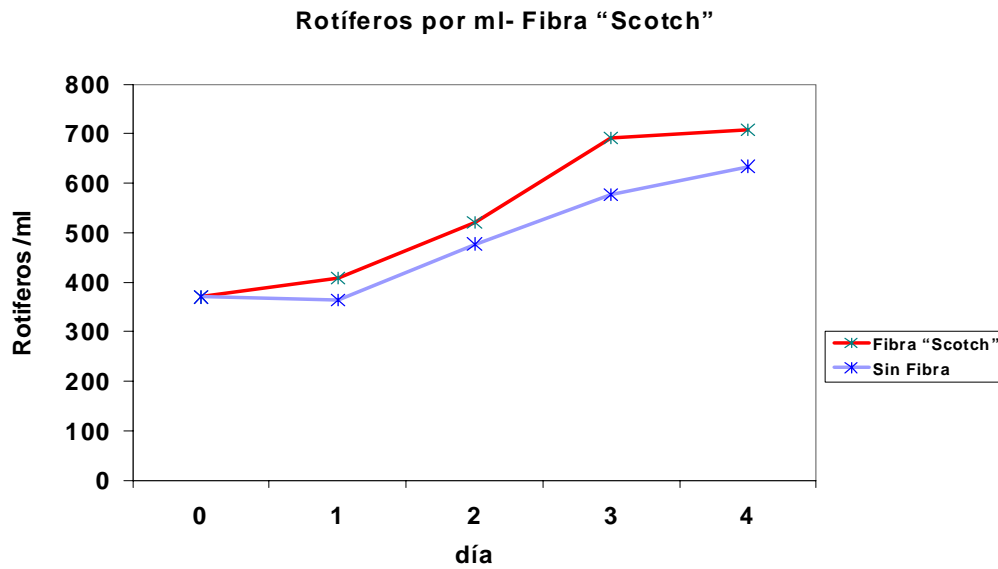
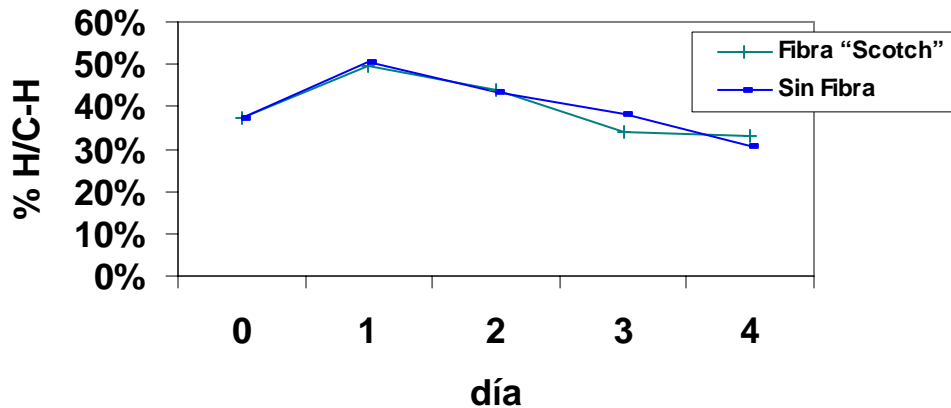


Fig. 32.- Densidad de rotíferos durante el experimento del uso de filtros (Fibra “Scotch Bright”) de materia orgánica.

**A) % HEMBRAS CON HUEVO  
Fibra "Scotch"**



**B) FECUNDIDAD- Fibra "Scotch"**

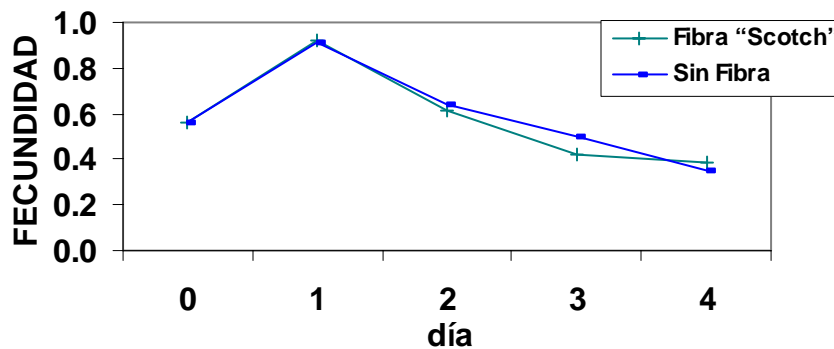


Fig. 33.- A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros (Fibra "Scotch Bright") de materia orgánica.

El segundo día se detectó un incremento importante en el amonio no ionizado en los cultivos masivos de rotíferos sin filtros (Fig. 34). El análisis de varianza ( $P = 0.191$ ) indicó que la diferencia era estadísticamente significativa ( $P = 0.004$ ) a causa del tratamiento a lo

largo del día. En el tratamiento con filtro, las concentraciones de amonio no ionizado durante los días de cultivo fueron marcadamente estables y menores.

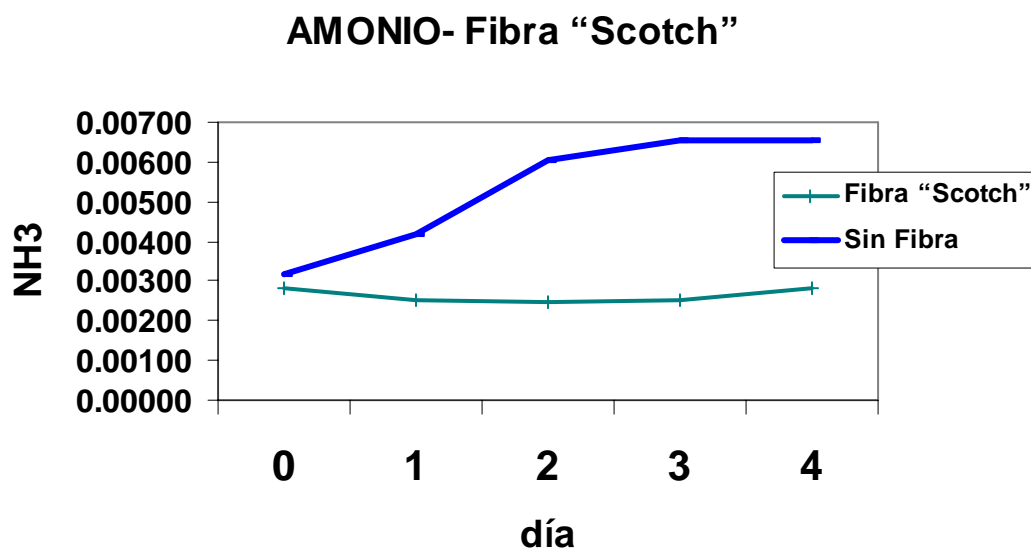


Fig. 34.- Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros de materia orgánica.

En ambos tratamientos, el oxígeno disuelto se mantuvo de manera uniforme a lo largo del tiempo ( $11.3 \pm 3.6$  ppm) y dentro del intervalo adecuado (10-15 ppm) a excepción del ultimo día en el que se acabo el cilindro de oxigeno puro antes de tomar la ultima medición Fig. 35, y cuya diferencia no fue estadísticamente significativa ( $P = 0.950$ ).

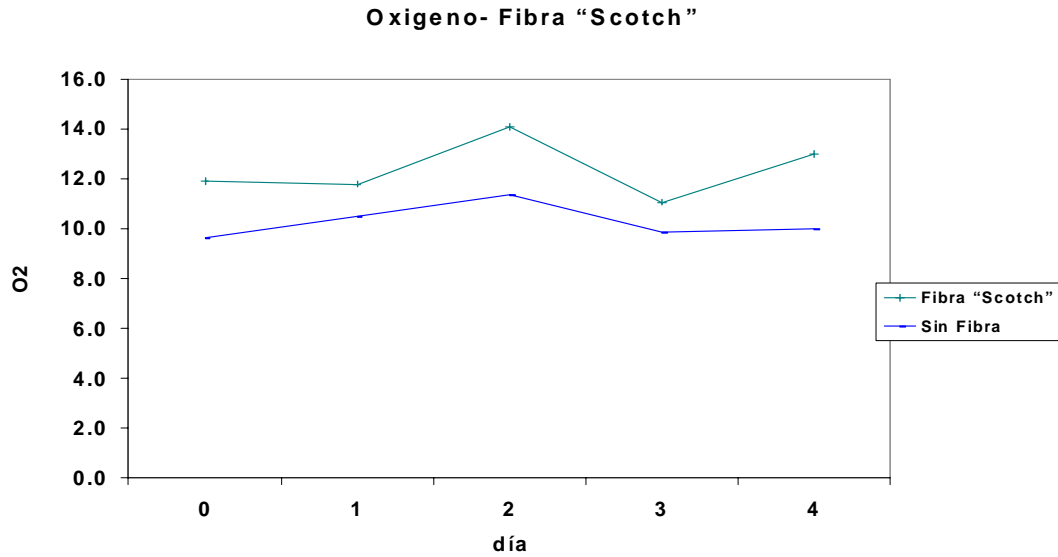


Fig. 35.- Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros (Fibra "Scotch Bright") de materia orgánica.

El pH en los tratamientos con y sin filtros no presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.051$ ), con valores ( $7.95 \pm 0.15$ ) en ambos tratamientos manteniéndose dentro del intervalo óptimo 7.5 - 8.5 (Tabla 1) durante los días del cultivo (Fig. 36).

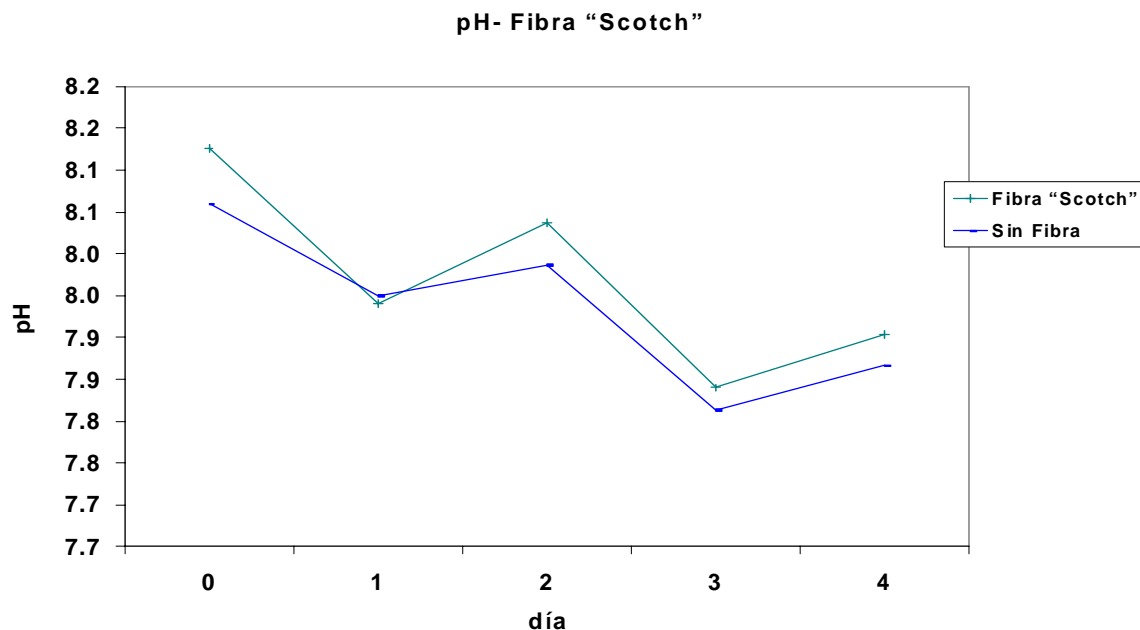


Fig. 36.- Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de filtros (Fibra "Scotch Bright") de materia orgánica.

La temperatura se mantuvo estable, con máximas de  $25.5 \pm 0.5$  y mínimas de 24 durante los días de cultivo (Fig. 37).

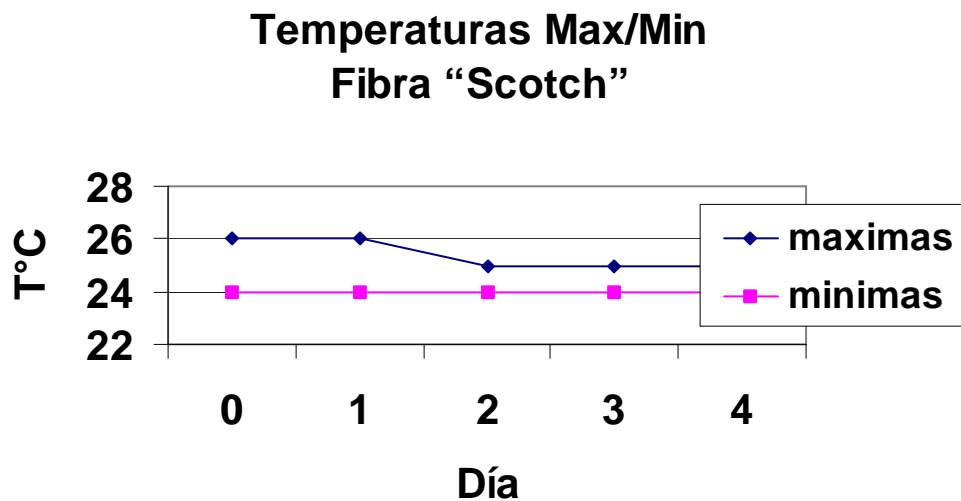


Fig. 37.- Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de filtros (Fibra "Scotch Bright") de materia orgánica.

La tasa de crecimiento fue de  $0.14 \pm 0.07$  en el tratamiento con filtros (Fibra “Scotch Bright”) y  $0.12 \pm 0.01$  para el tratamiento sin filtros (Fig. 38), lo cual indicó que los filtros utilizados influyeron positivamente en el crecimiento de la población.

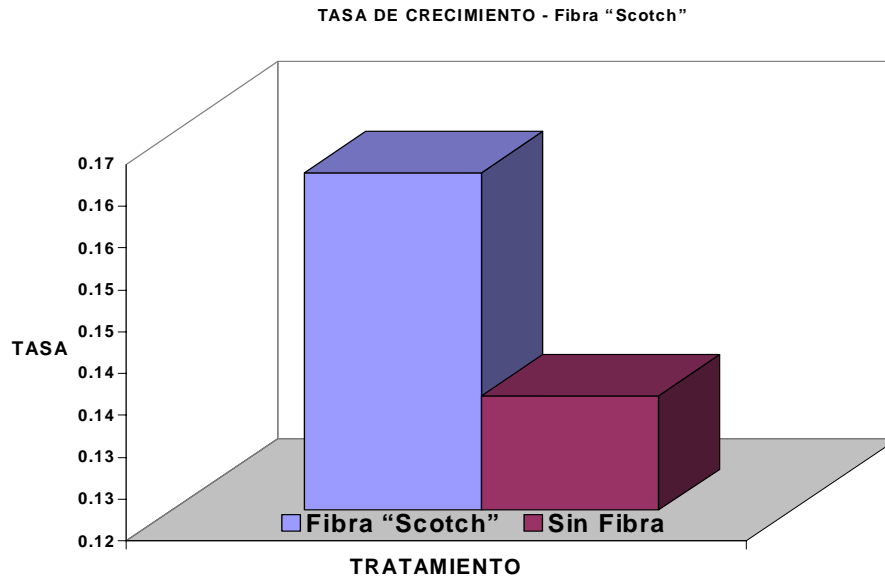


Fig. 38.- Tasa de crecimiento (K) en cada uno de los tanques en el experimento de uso de filtros (Fibra “Scotch Bright”) de materia orgánica.

### 7.3.3 Experimento 3: Uso de sistema filtro tipo “air-lift” para la colecta de materia orgánica

A partir de una siembra inicial de  $251 \pm 40$  rotíferos/ml, el tratamiento con filtro fue el que obtuvo los mayores niveles  $791 \pm 37$  rotíferos/ml (sin filtro  $443 \pm 77$  rotíferos/ml) (Fig. 39). El comportamiento de las replicas fue similar en cada uno de los dos tratamientos. La prueba de normalidad al igual que el análisis de varianza a lo largo de todo el experimento no son claros, sin embargo la primer aproximación indica que existe diferencia estadísticamente significativa a partir del segundo día ( $P=0.004$ ) y mas marcada durante el tercero ( $P<0.001$ ), existiendo una interacción entre la densidad de rotíferos y el uso de filtros.



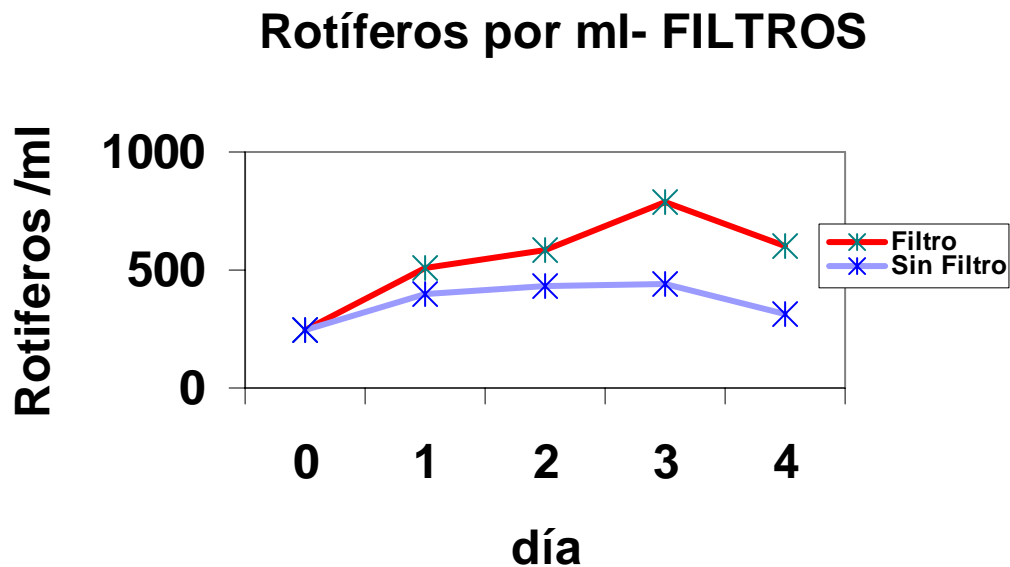


Fig. 39.- Densidad de rotíferos durante el experimento del uso de filtros de materia orgánica.

En el índice de fecundidad y el porcentaje de hembras con huevos se apreció un comportamiento similar (Fig.40), El análisis de varianza indicó que la diferencia entre cada uno de los tratamientos eran estadísticamente significativa durante el tercer y cuarto día, en la fecundidad ( $P = 0.019$ ) y en el porcentaje de hembras con huevo ( $P=0.015$ ) por el uso de filtros, teniendo las menores cantidades los tanques con el tratamiento sin filtros.

El segundo día se detectó un incremento importante en el amonio no ionizado en los cultivos masivos de rotíferos sin filtros (Fig. 41). El análisis de varianza ( $P = 1.000$ ) indicó que la diferencia era estadísticamente significativa ( $P<0.001$ ) a causa del tratamiento a lo largo de los días. En el tratamiento con filtro, las concentraciones de amonio no ionizado durante los días de cultivo fueron marcadamente inferiores.

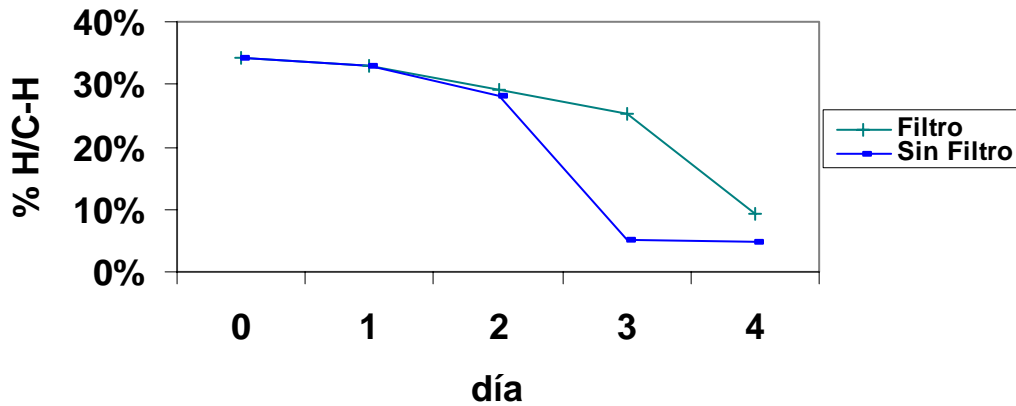
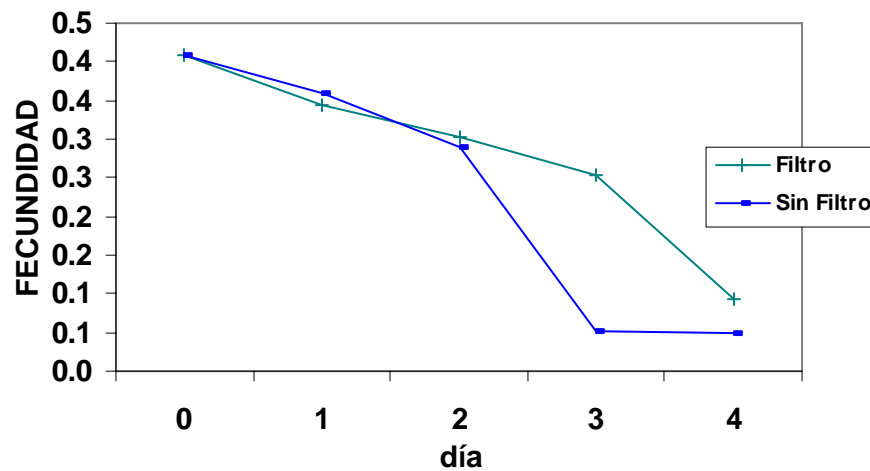
**A)****% HEMBRAS CON HUEVO  
FILTROS****B)****FECUNDIDAD- FILTROS**

Fig. 40.- A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros de materia orgánica.

En ambos tratamientos, el oxígeno disuelto se mantuvo de manera uniforme a lo largo del tiempo ( $14.6 \pm 0.6$  ppm) y dentro del intervalo adecuado (10-15 ppm) Fig. 42, y cuya diferencia no fue estadísticamente significativa ( $P = 0.266$ ).

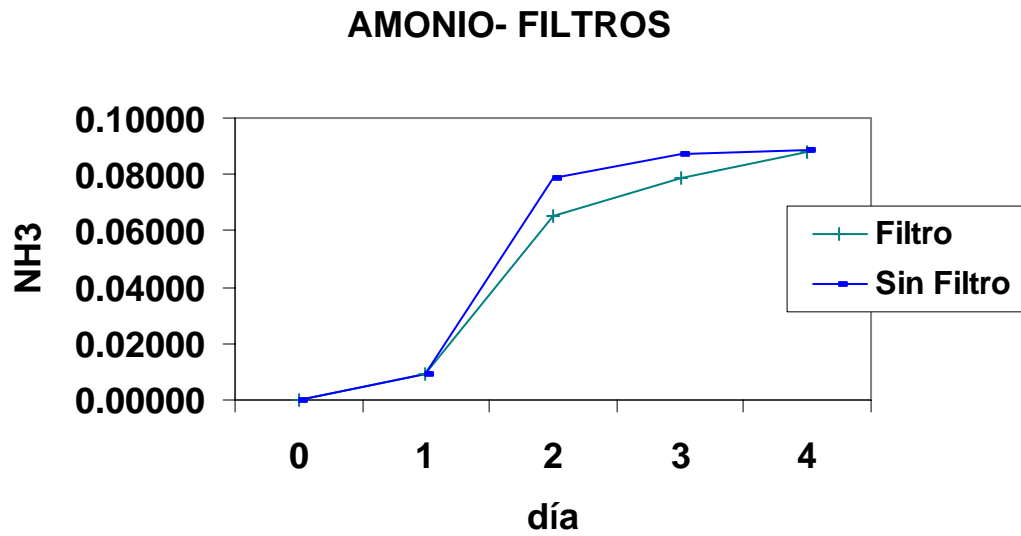


Fig. 41.- Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros de materia orgánica.

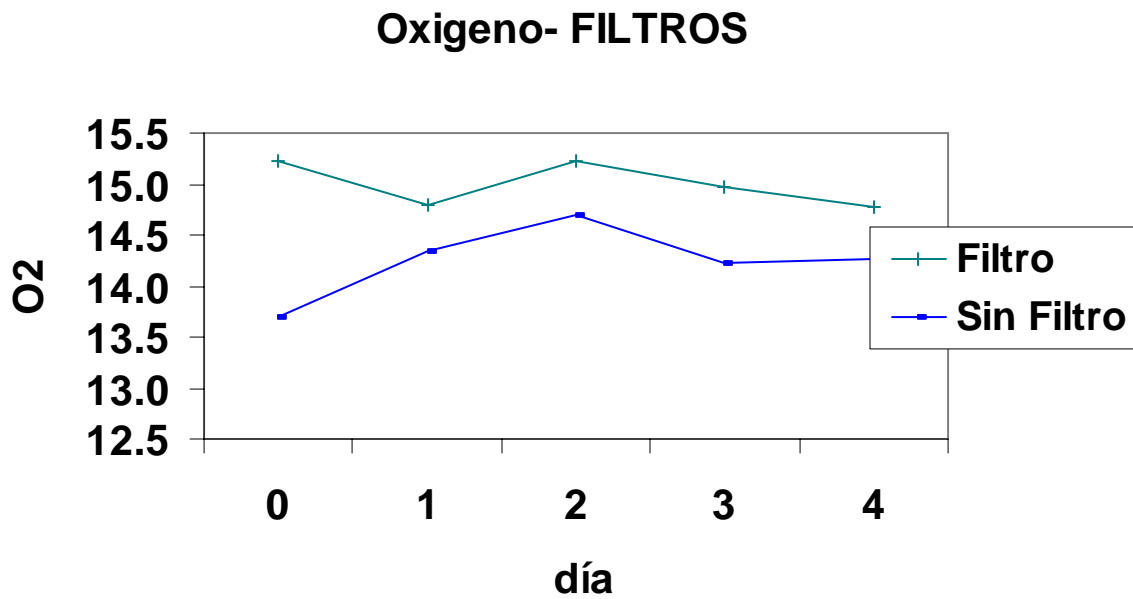


Fig. 42.- Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de filtros de materia orgánica.

El pH en los tratamientos con y sin filtros presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P = <0.001$ ), con valores de  $8.3 \pm 0.1$  con filtro y  $8.2 \pm 0.1$  sin filtro, en ambos tratamientos manteniéndose dentro del intervalo óptimo 7.5 - 8.5 (Tabla 1) durante los días del cultivo (Fig. 43).

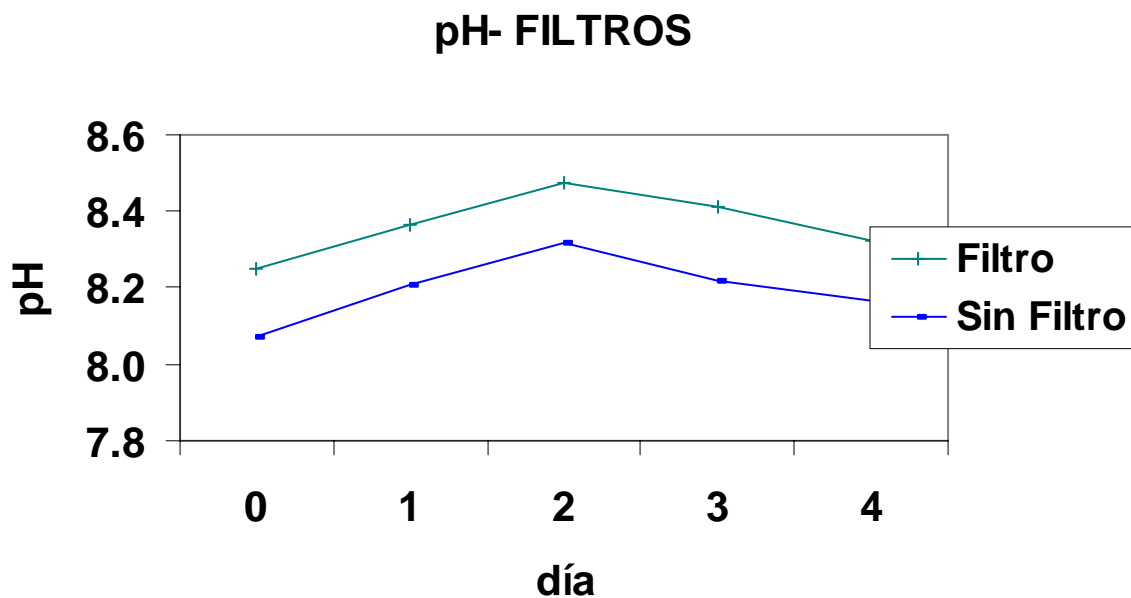


Fig. 43.- Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de filtros de materia orgánica.

La temperatura se mantuvo estable, con máximas de  $30.5 \pm 0.5$  y mínimas de  $25 \pm 1$  durante los días de cultivo (Fig. 44).

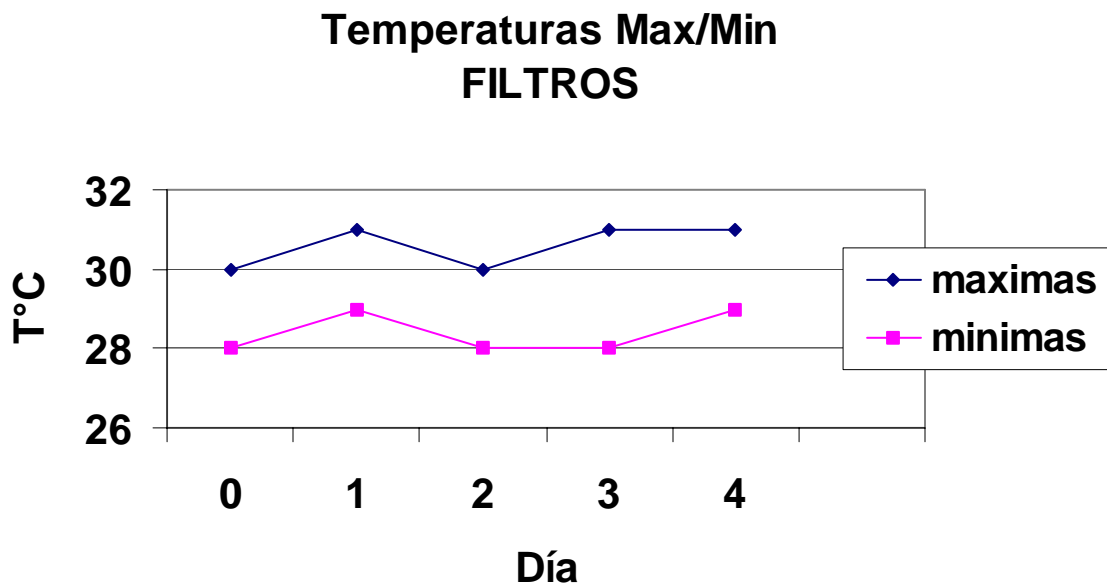


Fig. 44.- Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de filtros de materia orgánica.

La tasa de crecimiento (K) fue de  $0.21 \pm 0.06$  en el tratamiento con filtros y  $0.055 \pm 0.005$  para el tratamiento sin filtros (Fig. 45), lo cual indicó que los filtros utilizados influyeron positivamente en el crecimiento de la población.

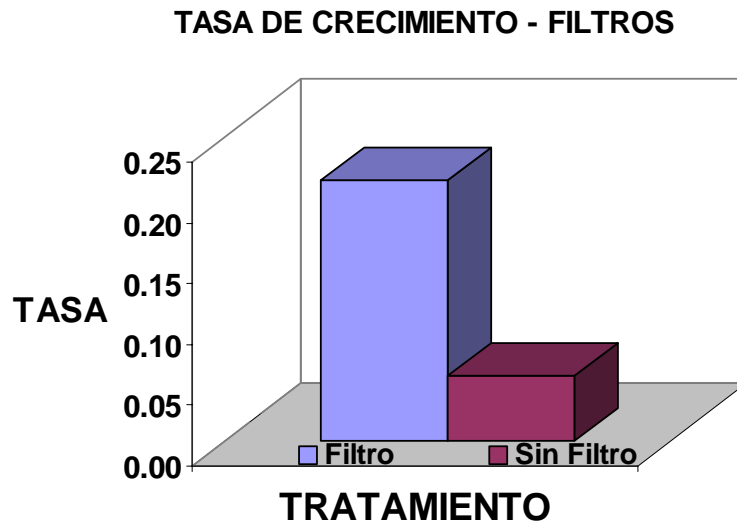


Fig. 45.- Tasa de crecimiento (K) en cada uno de los tanques en el experimento de uso de filtros de materia orgánica.

#### 7.3.4 Experimento 4: Uso de bombas peristálticas (alimentadores continuos)

A partir de una siembra inicial de  $418 \pm 25$  rotíferos/ml, el tratamiento con alimentador fue el que obtuvo los mayores niveles  $867 \pm 39$  rotíferos/ml (sin alimentador  $521 \pm 36$  rotíferos/ml) (Fig. 46). El comportamiento de las replicas fue similar en cada uno de los dos tratamientos. La prueba de normalidad no es clara ( $P < 0.050$ ), el análisis de varianza si ( $P = 0.613$ ), el análisis indica que existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ), existiendo una interacción entre la densidad de rotíferos el día transcurrido y el uso del alimentador.

## Rotíferos por ml- ALIMENTADORES

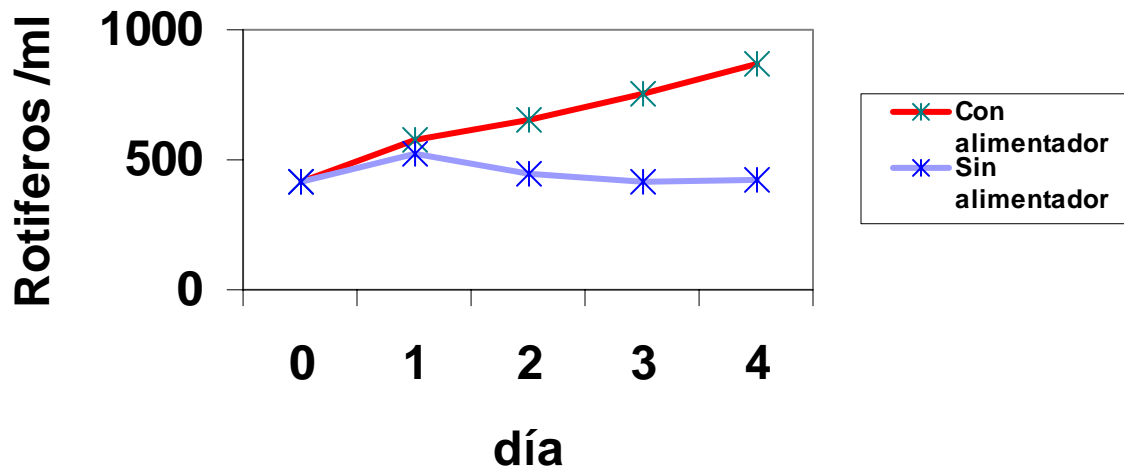


Fig. 46.- Densidad de rotíferos durante el experimento del uso de alimentador.

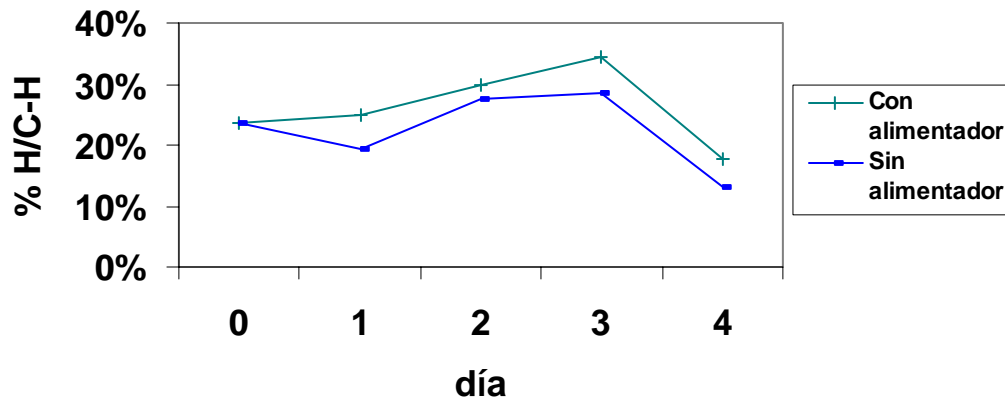
En el índice de fecundidad y el porcentaje de hembras con huevos se apreció un comportamiento similar (Fig.47), El análisis de varianza indicó que la diferencia entre cada uno de los tratamientos eran estadísticamente significativa, tanto en la fecundidad como en el porcentaje de hembras con huevo ( $P < 0.001$ ) por el uso de alimentador, teniendo las menores cantidades los tanques con el tratamiento sin alimentador.

A partir del segundo día se detectó un incremento importante en el amonio no ionizado en los cultivos masivos de rotíferos sin alimentador (Fig. 48). El análisis de varianza ( $P = 1.000$ ) indicó que la diferencia era estadísticamente significativa ( $P=0.001$ ) a causa del tratamiento a lo largo de los días. En el tratamiento con alimentador, las concentraciones de amonio no ionizado durante los días de cultivo fueron marcadamente menores.

En ambos tratamientos, el oxígeno disuelto se mantuvo de manera uniforme a lo largo del tiempo  $12.7 \pm 1.4$ ppm con alimentador y  $10.0 \pm 1.6$  ppm sin alimentador, en ambos casos dentro del intervalo adecuado (10-15 ppm) Fig. 49, y con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ).

**A)**

**% HEMBRAS CON HUEVO  
ALIMENTADORES**



**B)**

**FECUNDIDAD- ALIMENTADORES**

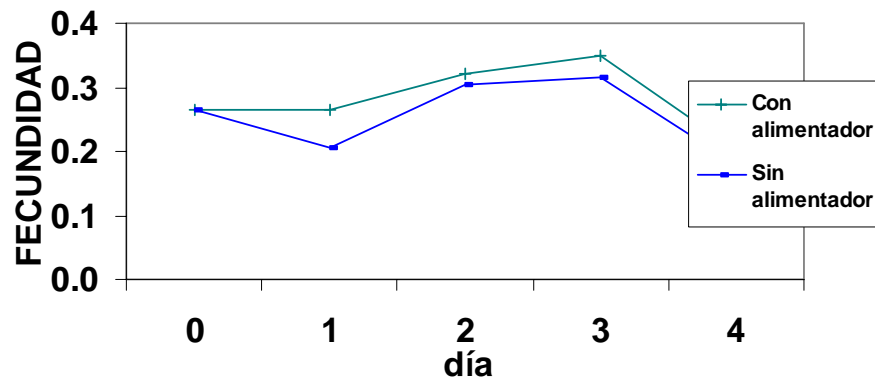


Fig. 47.- A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de alimentad.



### AMONIO- ALIMENTADORES

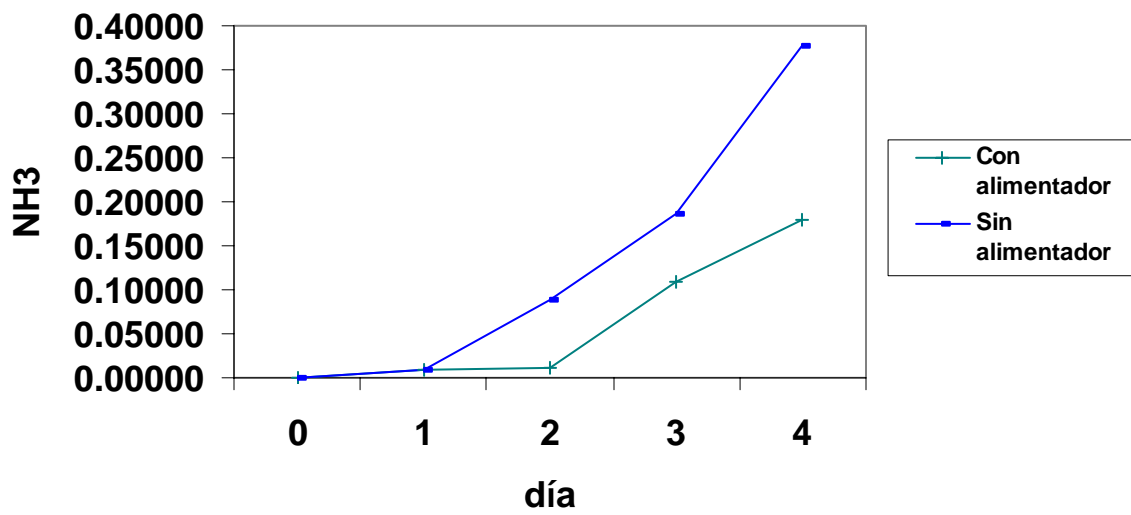


Fig. 48.- Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de alimentador.

### Oxigeno- ALIMENTADORES

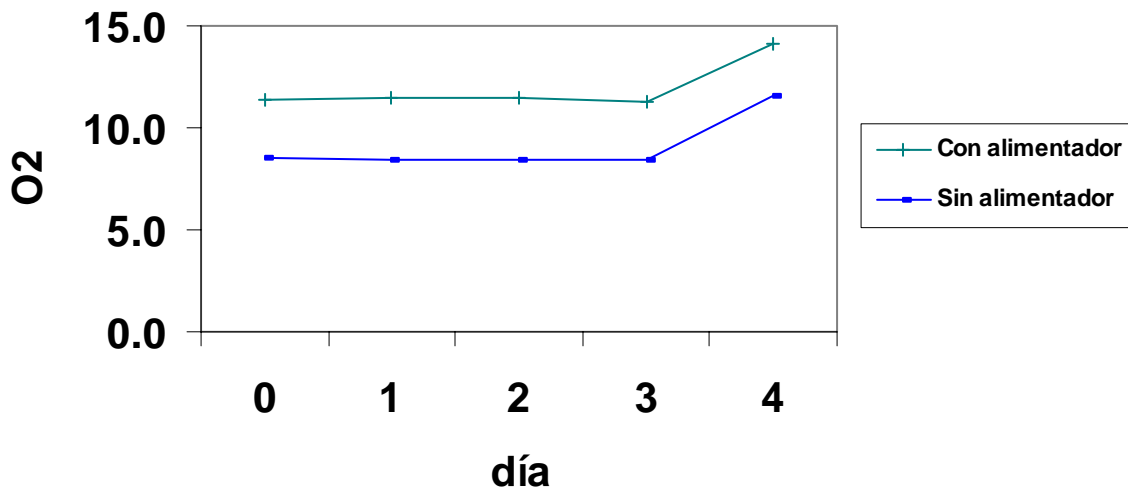


Fig. 49.- Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de alimentador.

El pH en los tratamientos con y sin alimentador presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P = <0.001$ ), con valores de  $8.25 \pm 0.15$  con alimentador y  $8.1 \pm 0.2$  sin filtro, en ambos tratamientos manteniéndose dentro del intervalo óptimo 7.5 - 8.5 (Tabla 1) durante los días del cultivo (Fig. 50).

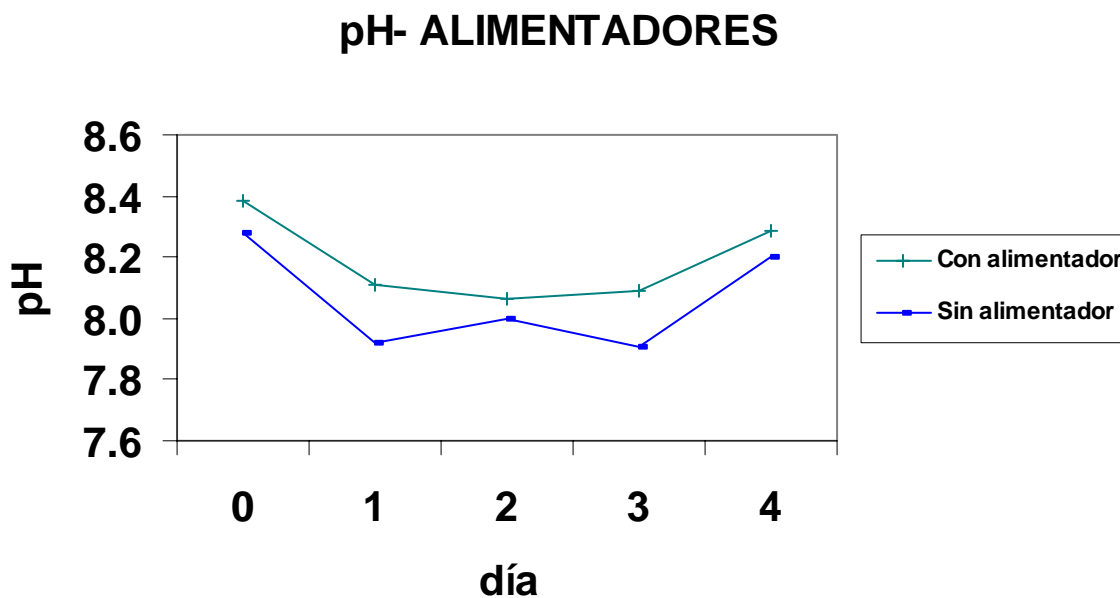


Fig. 50.- Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de alimentador.

La temperatura se mantuvo estable, con máximas de 31 y mínimas de  $29.5 \pm 0.5$  durante los días de cultivo (Fig. 51).

### Temperaturas Max/Min ALIMENTADORES

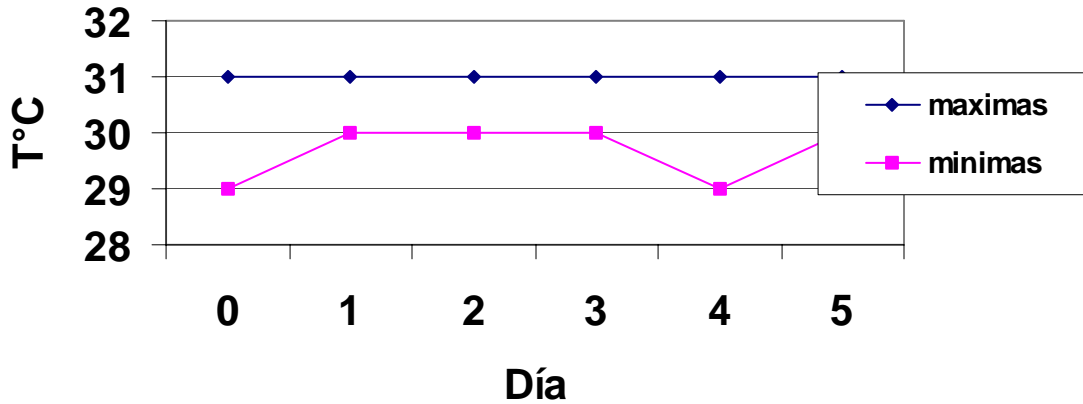


Fig. 51.- Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de alimentador.

La tasa de crecimiento fue de  $18 \pm 1$  en el tratamiento con alimentador y  $0 \pm 4$  para el tratamiento sin alimentador (Fig. 52), lo cual indicó que las bombas peristálticas utilizadas influyeron positivamente en el crecimiento de la población.

### TASA DE CRECIMIENTO - ALIMENTADORES

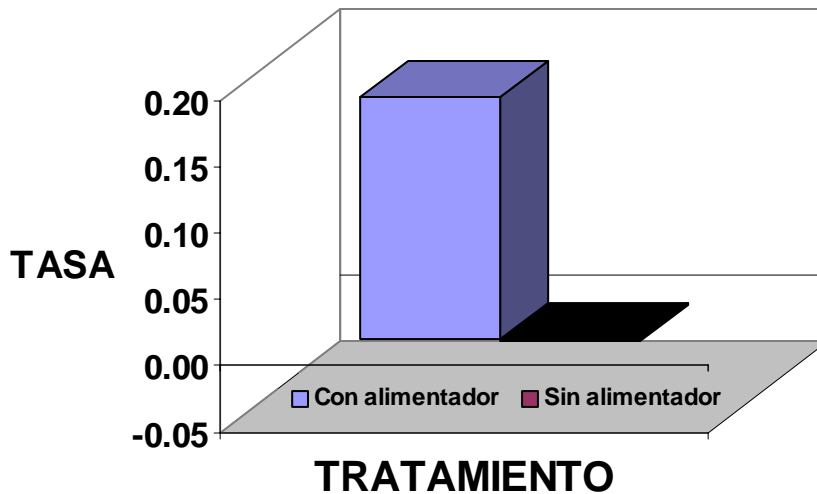


Fig. 52.- Tasa de crecimiento (K) en cada uno de los tanques en el experimento de uso de alimentador.

### 7.3.5 Experimento 5: Alimento (Selco 3000®-Selco Plus®)

A partir de una siembra inicial de  $222 \pm 12$  rotíferos/ml, el tratamiento con Selco Plus® fue el que obtuvo los mayores niveles  $1082 \pm 89$  rotíferos/ml (Selco 3000®  $930 \pm 42$  rotíferos/ml) (Fig. 53). El comportamiento de las replicas fue similar en cada uno de los dos tratamientos. El análisis de varianza ( $P=0.533$ ), indica que existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ), existiendo una interacción entre la densidad de rotíferos y el uso de alimento (Selco Plus®).

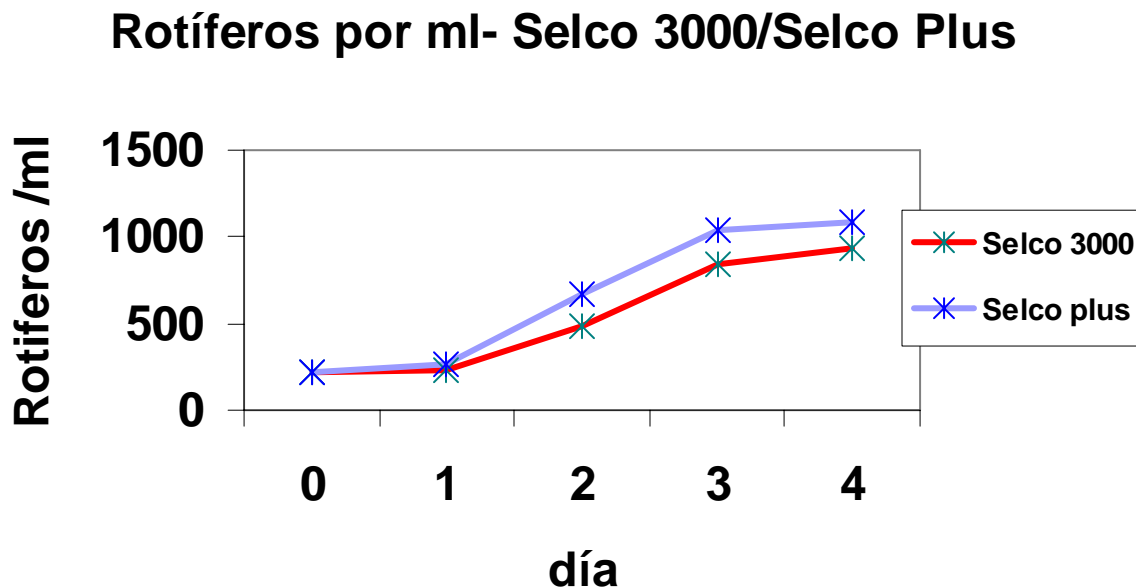


Fig. 53.- Densidad de rotíferos durante el experimento del uso de Selco Plus®.

En el índice de fecundidad y el porcentaje de hembras con huevos se apreció un comportamiento similar (Fig.54), El análisis de varianza indicó que la diferencia entre cada uno de los tratamientos eran estadísticamente significativa durante el tercer y cuarto día, en la fecundidad ( $P < 0.001$ ) y en el porcentaje de hembras con huevo ( $P < 0.001$ ) por el uso de Selco Plus®, teniendo las menores cantidades los tanques con el alimento Selco 3000®.

El segundo día se detectó un incremento importante en el amonio no ionizado en ambos tratamientos (Fig. 55). El análisis de varianza ( $P = 1.000$ ) indicó que la diferencia era estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ) a causa del tratamiento a lo largo de los días. En el

tratamiento con de Selco Plus®, las concentraciones de amonio no ionizado durante los días de cultivo fueron marcadamente menores.

En ambos tratamientos, el oxígeno disuelto se mantuvo de manera uniforme a lo largo del tiempo  $12.5 \pm 2.8$  ppm con Selco Plus® y  $12.05 \pm 2.35$  ppm con Selco 3000®, en ambos casos dentro del intervalo adecuado (10-15 ppm) Fig. 56, y con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ).

El pH en los tratamientos con Selco 3000® y Selco Plus® presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P = < 0.001$ ), con valores de  $8.25 \pm 1.5$  con Selco Plus® y  $8.4 \pm 1$  Selco 3000®, en ambos tratamientos manteniéndose dentro del intervalo óptimo 7.5 - 8.5 (Tabla 1) durante los días del cultivo (Fig. 57).

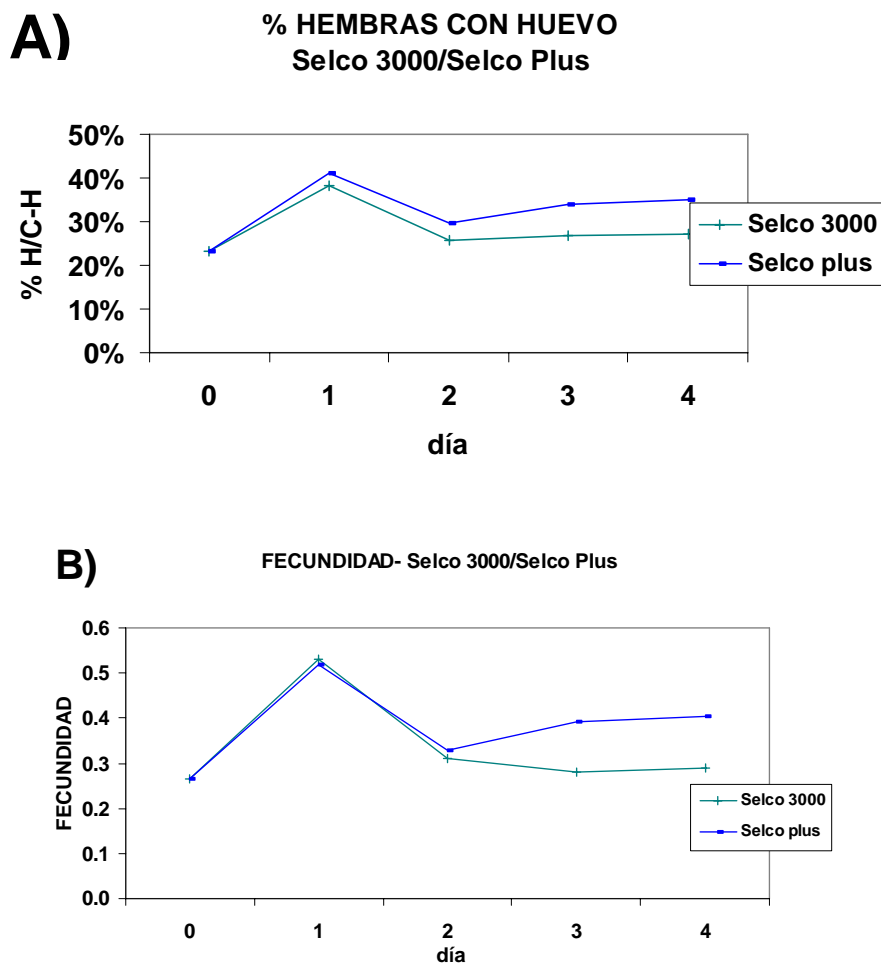


Fig. 54.- A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de Selco Plus®.

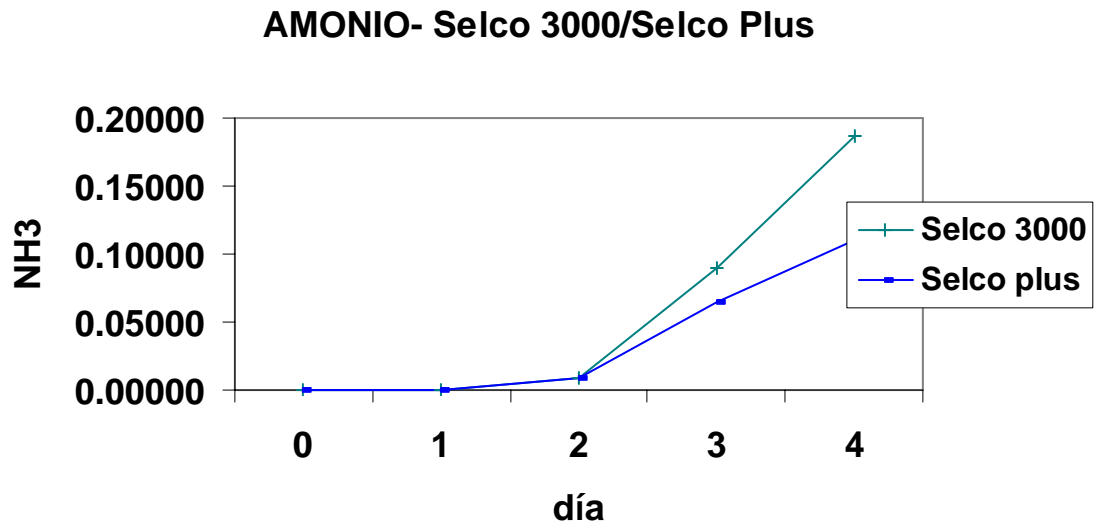


Fig. 55.- Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de Selco Plus®.

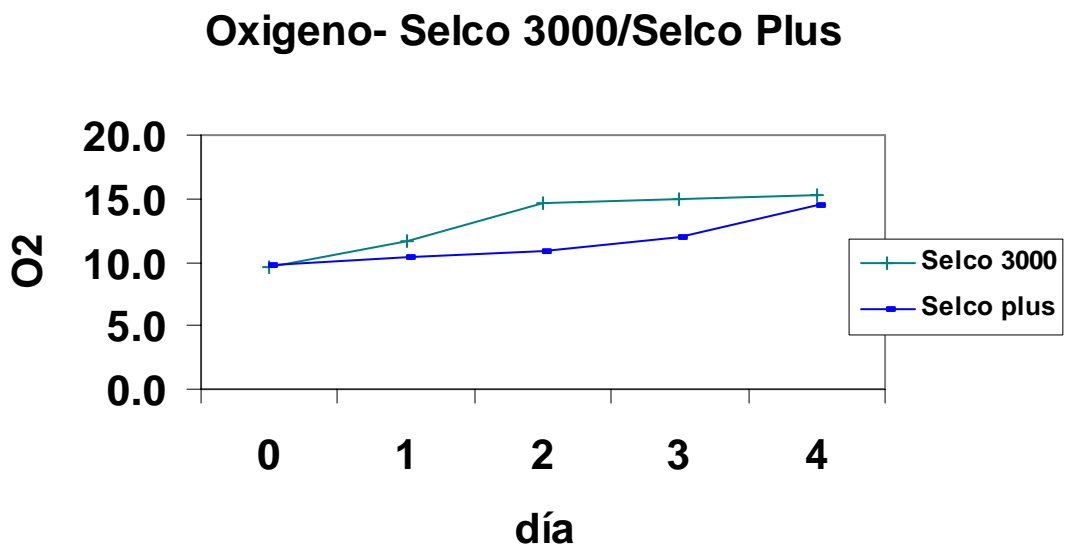


Fig. 56.- Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de uso de Selco Plus®.

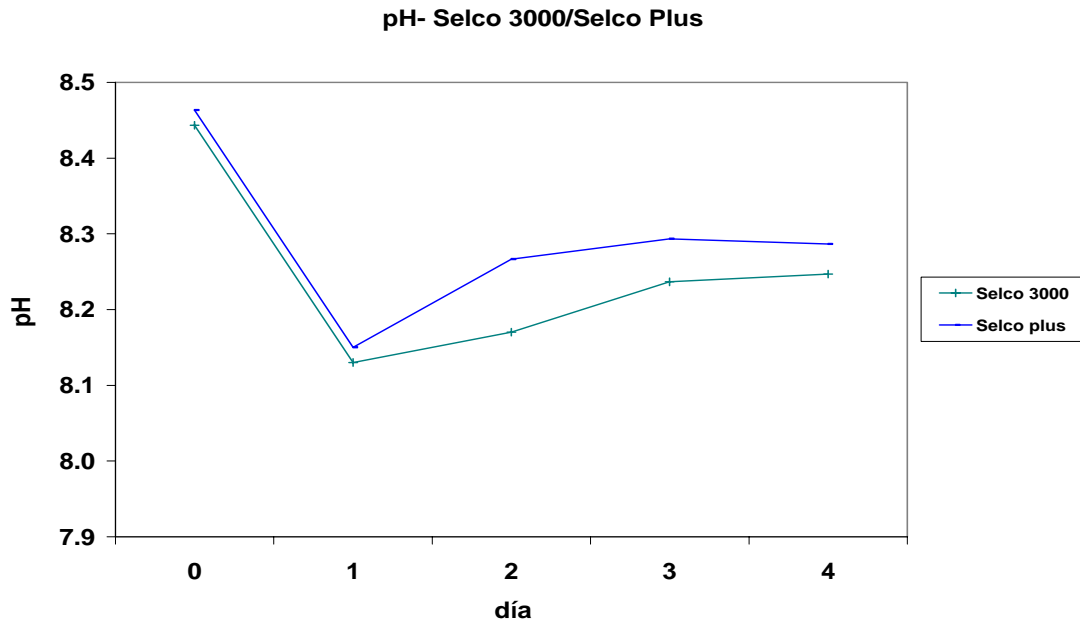


Fig. 57.- Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de uso de Selco Plus®.

La temperatura se mantuvo estable, con máximas de  $30.5 \pm 0.5$  y mínimas de  $29 \pm 1$  durante los días de cultivo (Fig. 58).

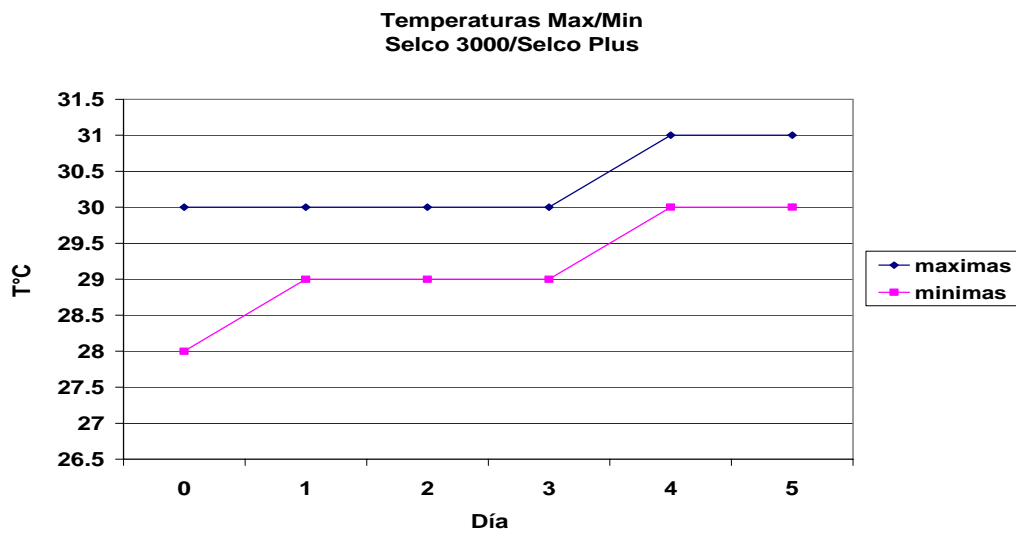


Fig. 58.- Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de Selco Plus®.

La tasa de crecimiento (K) fue de  $39 \pm 3$  en el tratamiento con Selco Plus® y  $35.5 \pm 1.5$  para el tratamiento con Selco 3000® (Fig. 59), lo cual indicó que la alimentación con Selco Plus® influyó positivamente en el crecimiento de la población.

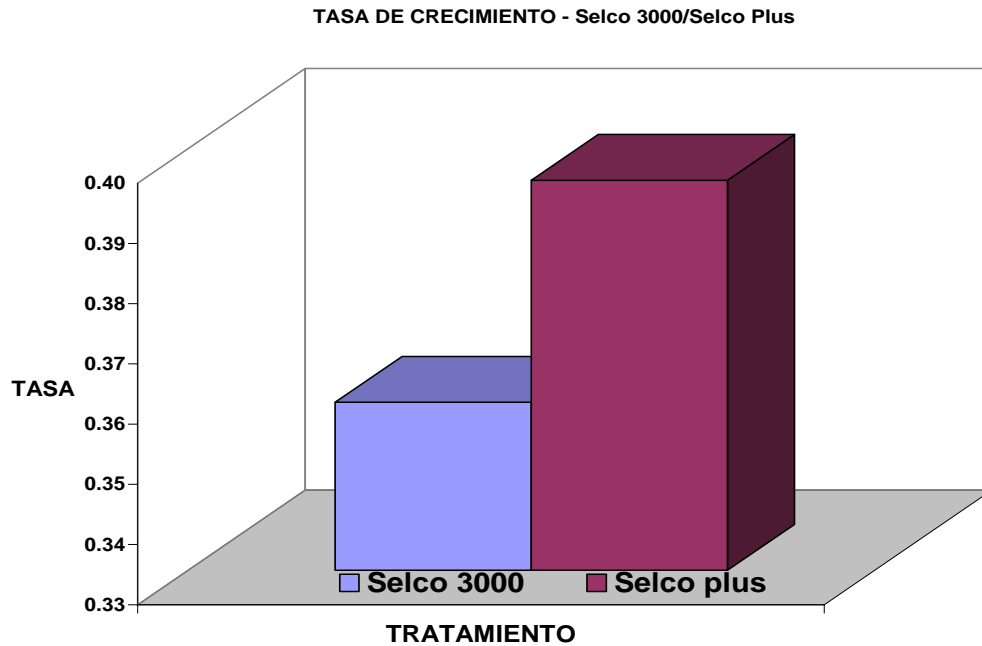


Fig. 59.- Tasa de crecimiento (K) en cada uno de los tanques en el experimento de uso de Selco Plus®.

### 7.3.6 Experimento 6: Alimento (Selco Plus® - Ori-Culture®)

A partir de una siembra inicial de  $265 \pm 24$  rotíferos/ml, el tratamiento con Selco Plus® fue el que obtuvo los mayores niveles  $642 \pm 7$  rotíferos/ml (Ori-Culture®  $591 \pm 4$  rotíferos/ml) (Fig. 60). El comportamiento de las replicas fue similar en cada uno de los dos tratamientos. La prueba de normalidad ( $P=0.089$ ) al igual que el análisis de varianza ( $P=0.546$ ), indican que existe diferencia estadísticamente significativa ( $P=<0.001$ ), existiendo una interacción entre la densidad de rotíferos y el uso de diferente alimento.



## Rotíferos por ml- ORI-CULTURE®

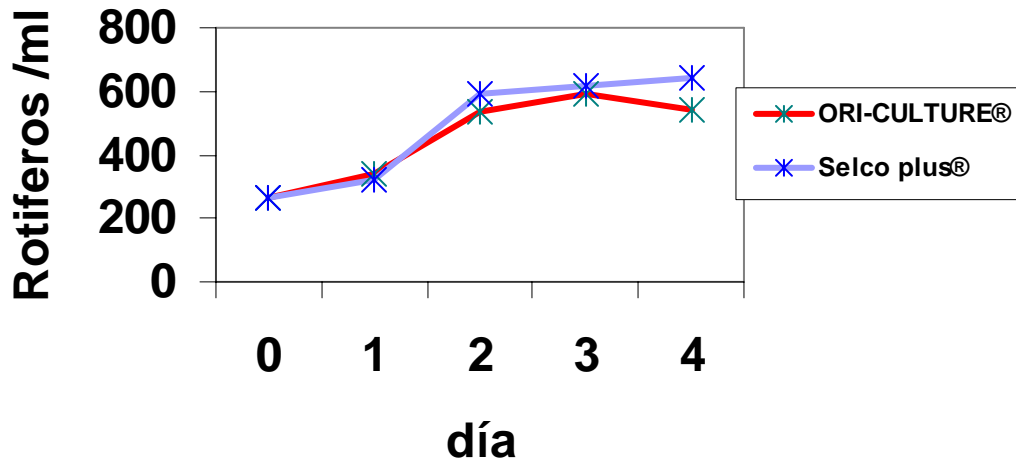


Fig. 60.- Densidad de rotíferos durante el experimento de alimento.

En el índice de fecundidad y el porcentaje de hembras con huevos se apreció un comportamiento similar (Fig.61), El análisis de varianza indicó que la diferencia entre cada uno de los tratamientos era estadísticamente significativa, en la fecundidad ( $P = < 0.001$ ) y en el porcentaje de hembras con huevo ( $P = < 0.001$ ) por el uso de Selco Plus®, teniendo las menores cantidades los tanques con el alimento Ori-Culture®.

El primer día se detectó un incremento en el amonio no ionizado en los cultivos masivos de rotíferos alimentados con Selco Plus® (Fig. 62). El análisis de varianza ( $P = 1.000$ ) indicó que la diferencia era estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ) a causa del tratamiento a lo largo de los días. En el tratamiento con Ori-Culture®, las concentraciones de amonio no ionizado durante los días de cultivo fueron marcadamente menores.

En ambos tratamientos, el oxígeno disuelto se mantuvo de manera uniforme a lo largo del tiempo  $11.0 \pm 0.6$  ppm con Selco Plus® ( $O_2$  puro) y  $5.3 \pm 0.7$  ppm con Ori-Culture® (aireación), en ambos casos dentro del intervalo adecuado (10-15 ppm y 5-7 ppm) Fig. 63, y con una diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.041$ ).

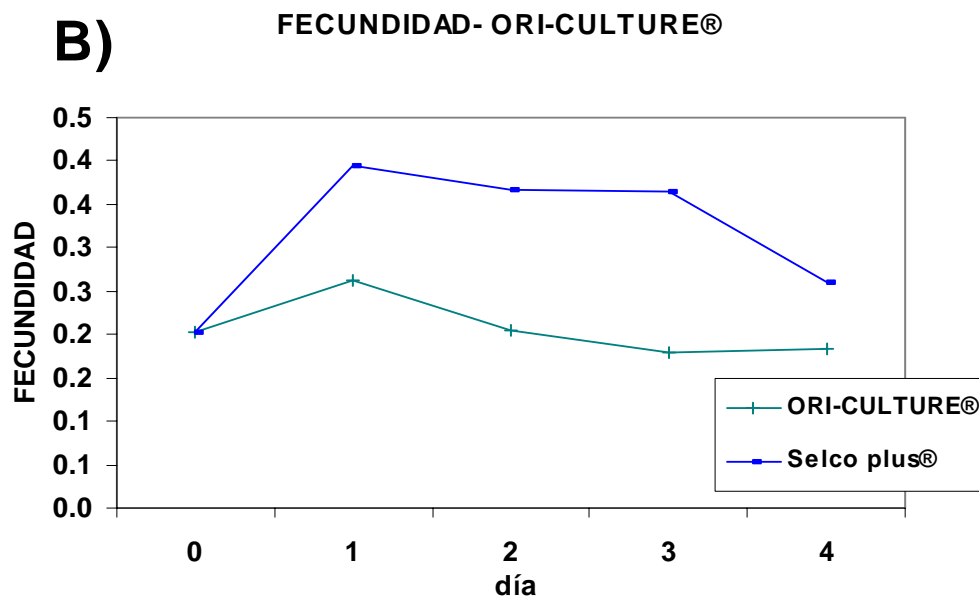
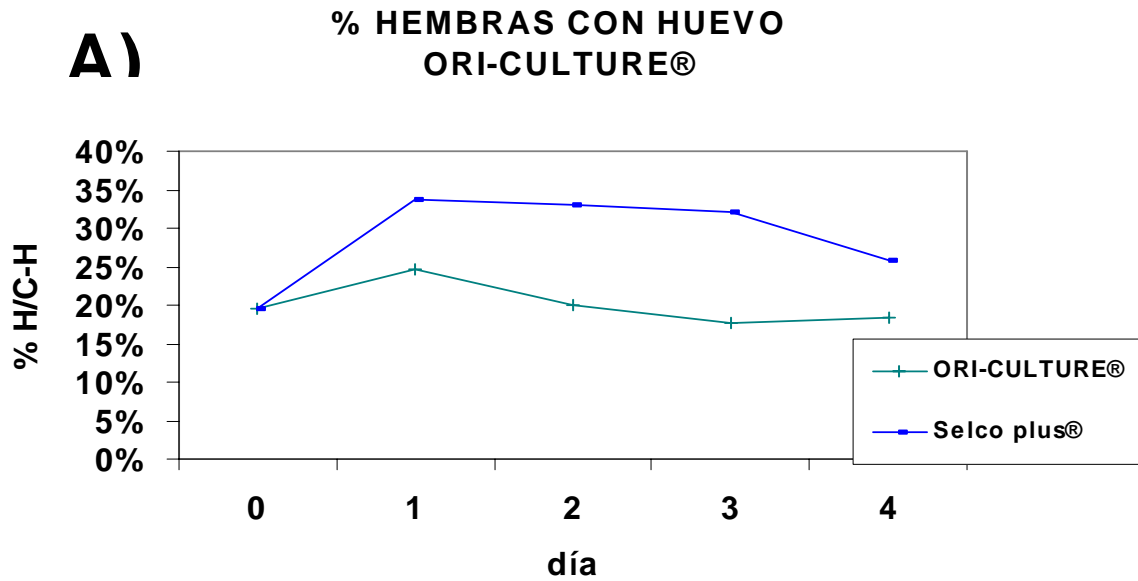


Fig. 61.- A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de alimento.

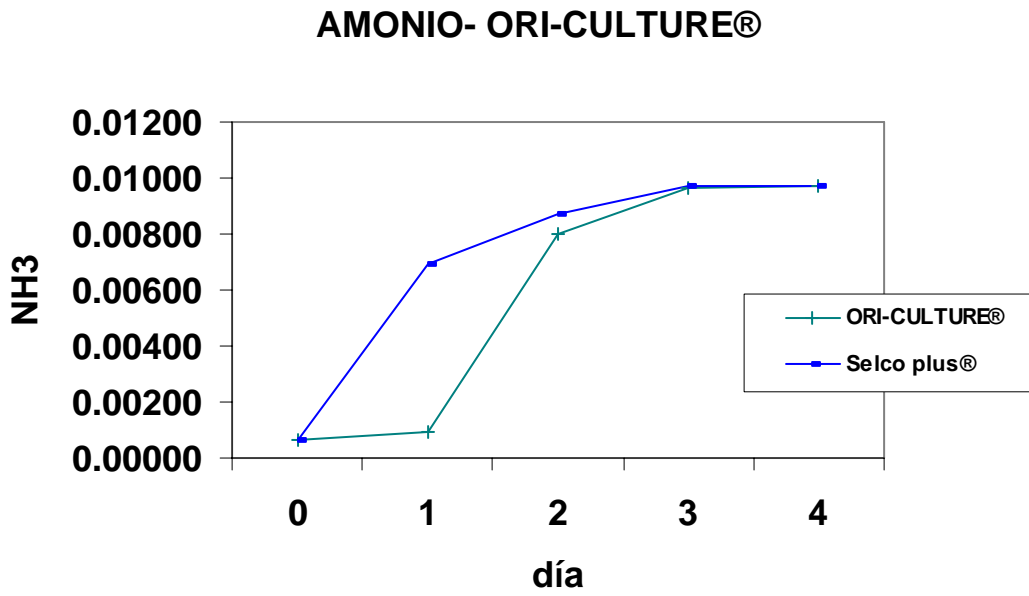


Fig. 62.- Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de alimento.

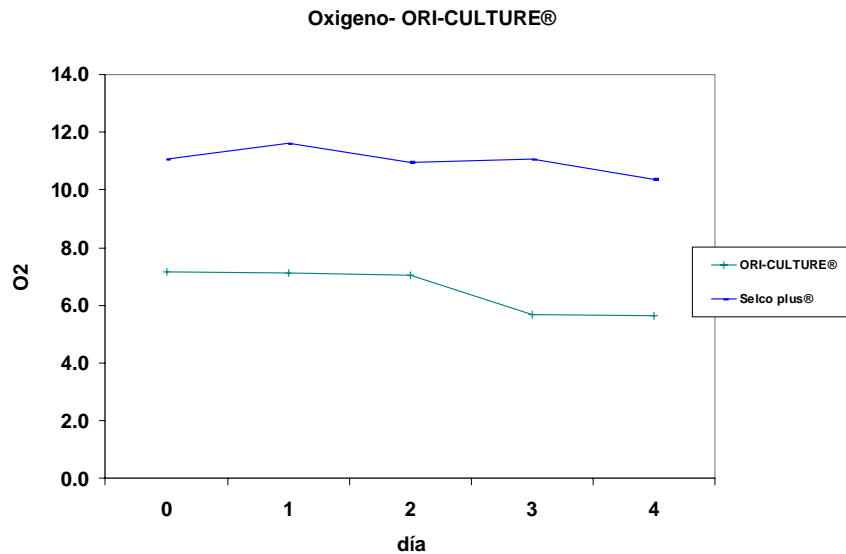


Fig. 63.- Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de alimento.

El pH en los tratamientos con Ori-Culture® y Selco Plus® presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P = <0.001$ ), con valores de  $8.05 \pm .25$  con Selco Plus® y  $8.25 \pm .25$  Ori-Culture®, en ambos tratamientos manteniéndose dentro del intervalo óptimo 7.5 - 8.5 (Tabla 1) durante los días del cultivo (Fig. 64).

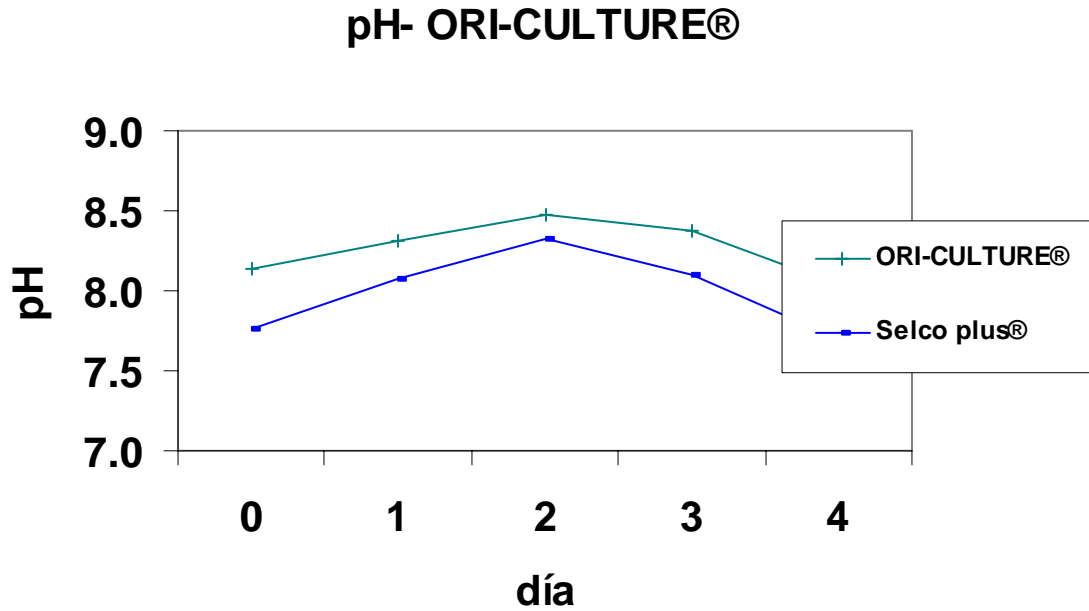


Fig. 64.- Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de alimento.

La temperatura se mantuvo estable, con máximas de  $31.5 \pm .5$  y mínimas de  $30.5 \pm .5$  durante los días de cultivo (Fig. 65).

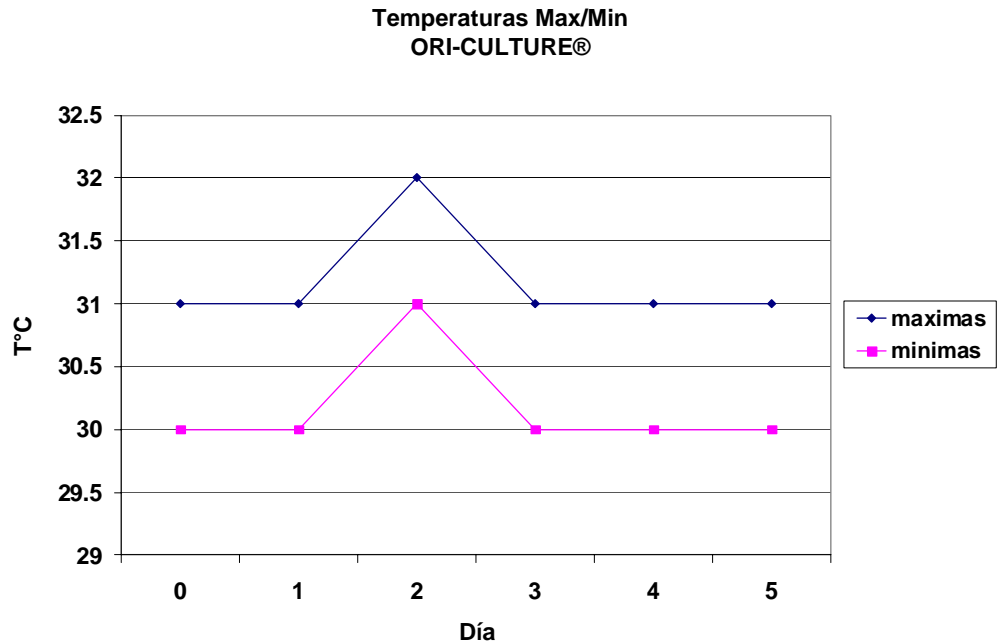


Fig. 65.- Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de alimento.

La tasa de crecimiento fue de 0.22 en el tratamiento con Selco Plus® y  $17.5 \pm 0.5$  para el tratamiento con Ori-Culture® (Fig. 66), lo cual indicó que la alimentación con Selco Plus® y oxígeno puro influyo positivamente en el crecimiento de la población.

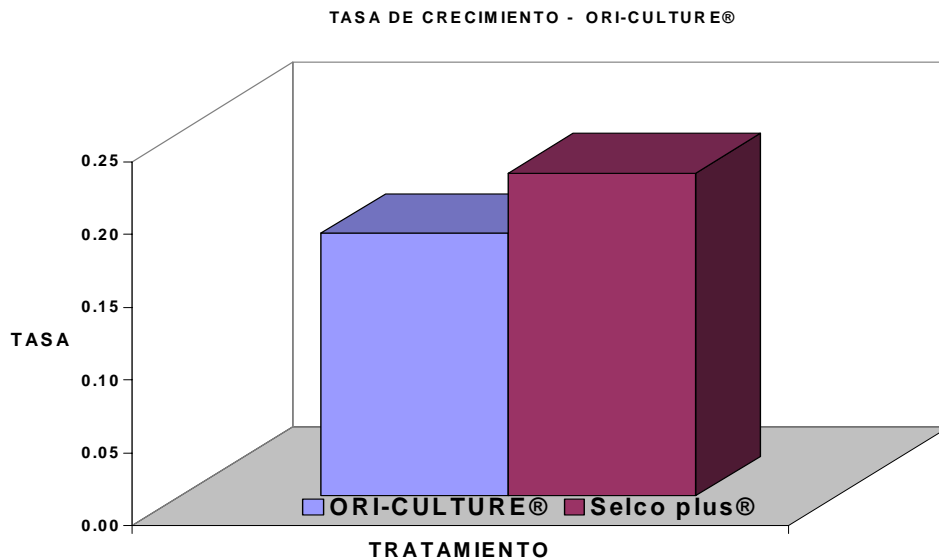


Fig. 66.- Tasa de crecimiento (K) en cada uno de los tanques en el experimento de alimento.

### 7.3.7 Experimento 7: Flujo continuo de agua.

A partir de una siembra inicial de  $251 \pm 43$  rotíferos/ml, el tratamiento con flujo continuo fue el que obtuvo los mayores niveles  $1380 \pm 12$  rotíferos/ml (sin flujo continuo  $1067 \pm 10$  rotíferos/ml declinando el 4º día) (Fig. 67). El comportamiento de las replicas fue similar en cada uno de los dos tratamientos. La prueba de normalidad no es clara, el análisis de varianza ( $P=0.580$ ), indica que existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ), existiendo una interacción entre la densidad de rotíferos y el flujo continuo a través del tiempo.

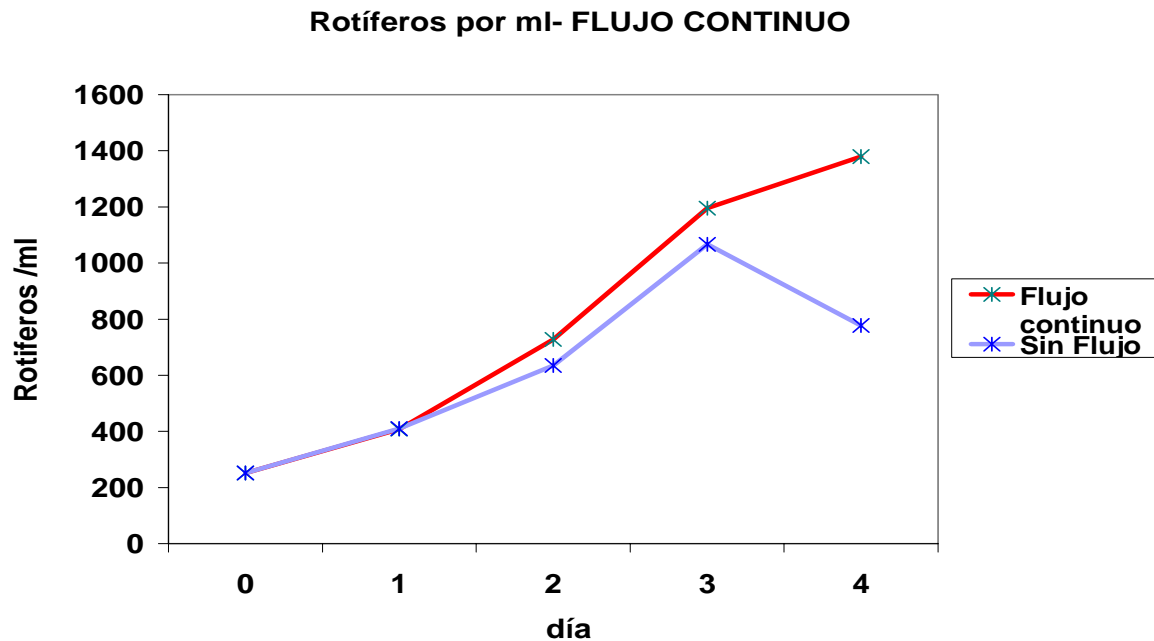


Fig. 67.- Densidad de rotíferos durante el experimento del uso de flujo continuo.

En el índice de fecundidad y el porcentaje de hembras con huevos (Fig.68), la prueba de normalidad  $P=0.071$  para flujo continuo y  $P=0.169$  sin flujo continuo, el análisis de varianza  $P=0.858$  para flujo continuo y  $P=0.823$  sin flujo continuo indican que la diferencia entre cada uno de los tratamientos eran estadísticamente significativa, en la fecundidad ( $P=0.004$ ) y en el porcentaje de hembras con huevo ( $P < 0.001$ ) por el flujo continuo a través del tiempo, teniendo las menores cantidades los tanques sin flujo continuo.

Desde el primer día se detectó la diferencia en el amonio no ionizado entre los tratamientos (Fig. 69). El análisis de varianza ( $P = 0.302$ ) indicó que la diferencia era estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ) a causa del flujo continuo a lo largo de los días. En el tratamiento con flujo continuo, las concentraciones de amonio no ionizado durante los días de cultivo fueron marcadamente menores.

En ambos tratamientos, el oxígeno disuelto se mantuvo de manera uniforme a lo largo del tiempo  $14.95 \pm 0.55$  ppm con flujo continuo y  $12.1 \pm 1.5$  ppm sin flujo continuo, en ambos casos dentro del intervalo adecuado (10-15 ppm) Fig. 70, y sin una diferencia estadísticamente significativa ( $P = < 0.061$ ).

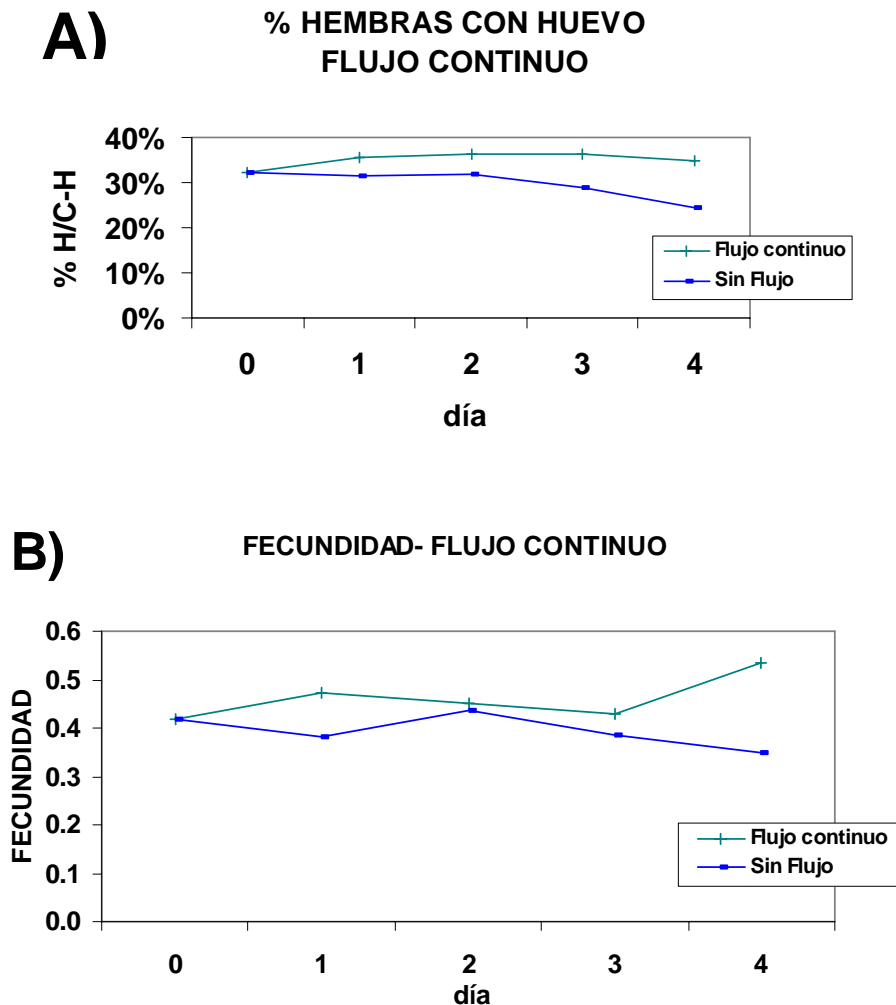


Fig. 68.- A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos en el experimento de flujo continuo.

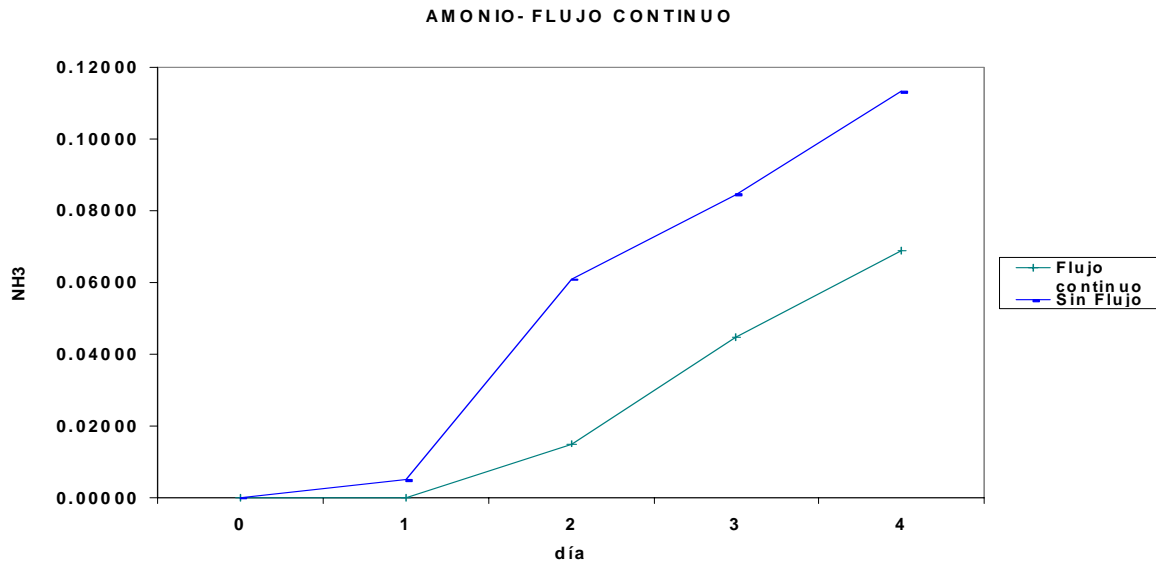


Fig. 69.- Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada uno de los tratamientos en el experimento de flujo continuo.

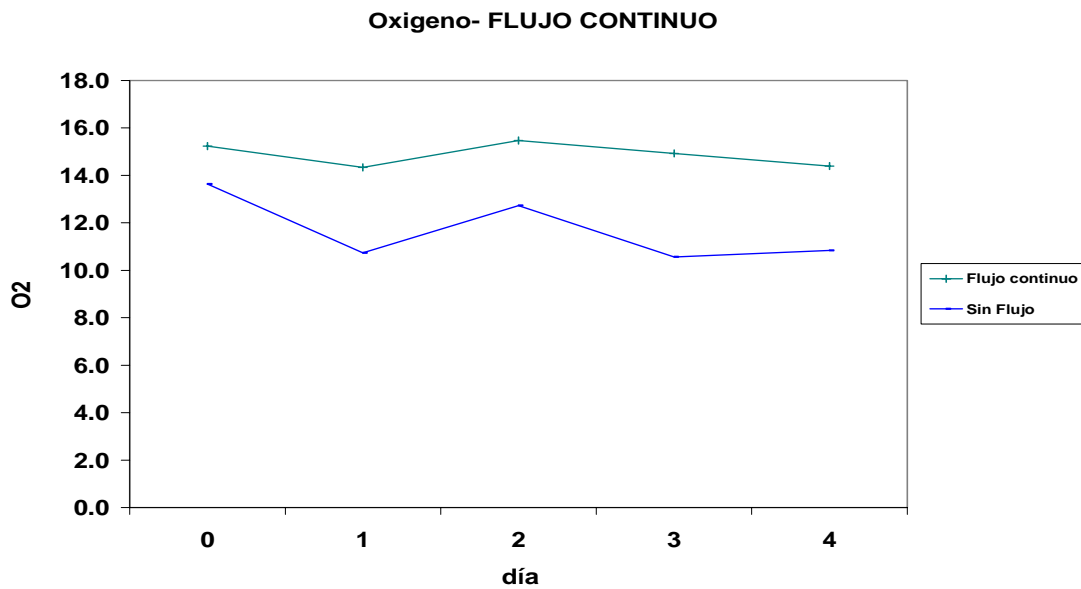


Fig. 70.- Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada uno de los tratamientos en el experimento de flujo continuo.



El pH en el experimento con flujo continuo presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P = <0.001$ ), con valores de  $8.1 \pm 0.4$  con flujo continuo y  $8.6 \pm 0.3$  sin flujo continuo, en el tratamiento con flujo continuo manteniéndose dentro del intervalo óptimo 7.5 - 8.5 (Tabla 1) mientras que el tratamiento sin flujo continuo se mantuvo cerca de los límites máximos del intervalo óptimo (Fig. 71).

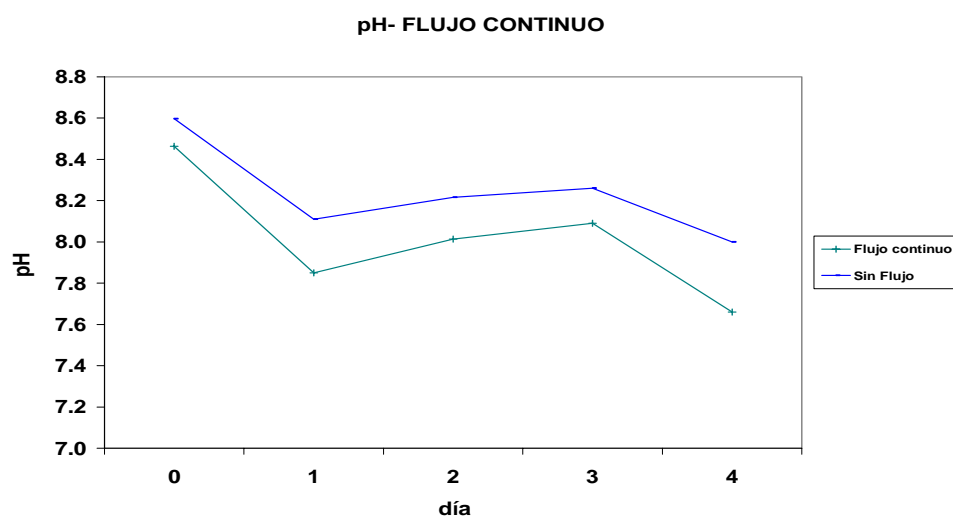


Fig. 71.- Valores de pH durante el transcurso de los experimentos con los tratamientos de flujo continuo.

La temperatura se mantuvo estable, con máximas de  $27 \pm 1$  y mínimas de  $23.5 \pm .5$  durante los días de cultivo (Fig. 72).

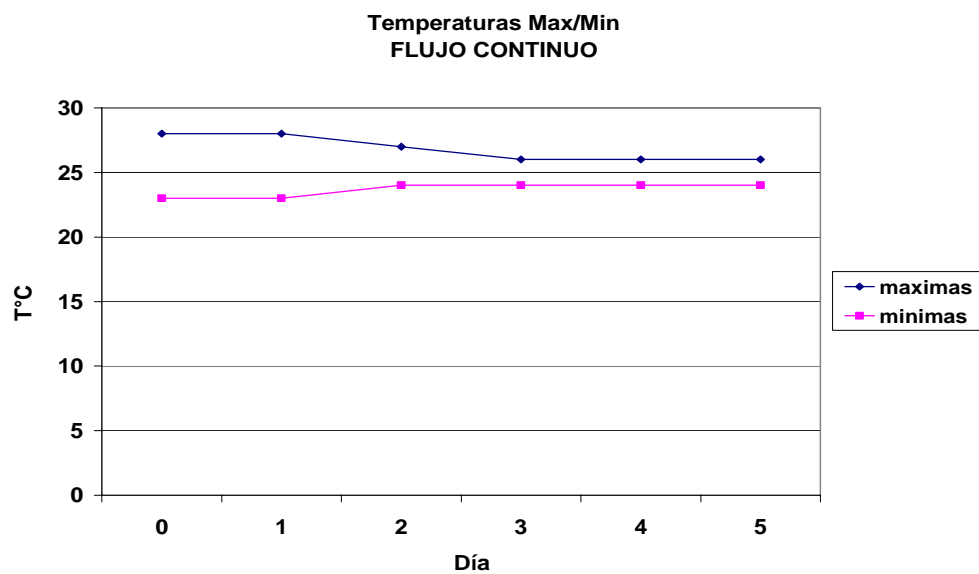


Fig. 72.- Temperaturas máximas y mínimas durante el experimento de uso de flujo continuo.

La tasa de crecimiento fue de  $42.5 \pm 5$  en el tratamiento con flujo continuo y  $29.5 \pm 4.5$  para el tratamiento sin flujo continuo (Fig. 73), lo cual indicó que el flujo continuo en el cultivo influyo positivamente en el crecimiento de la población.

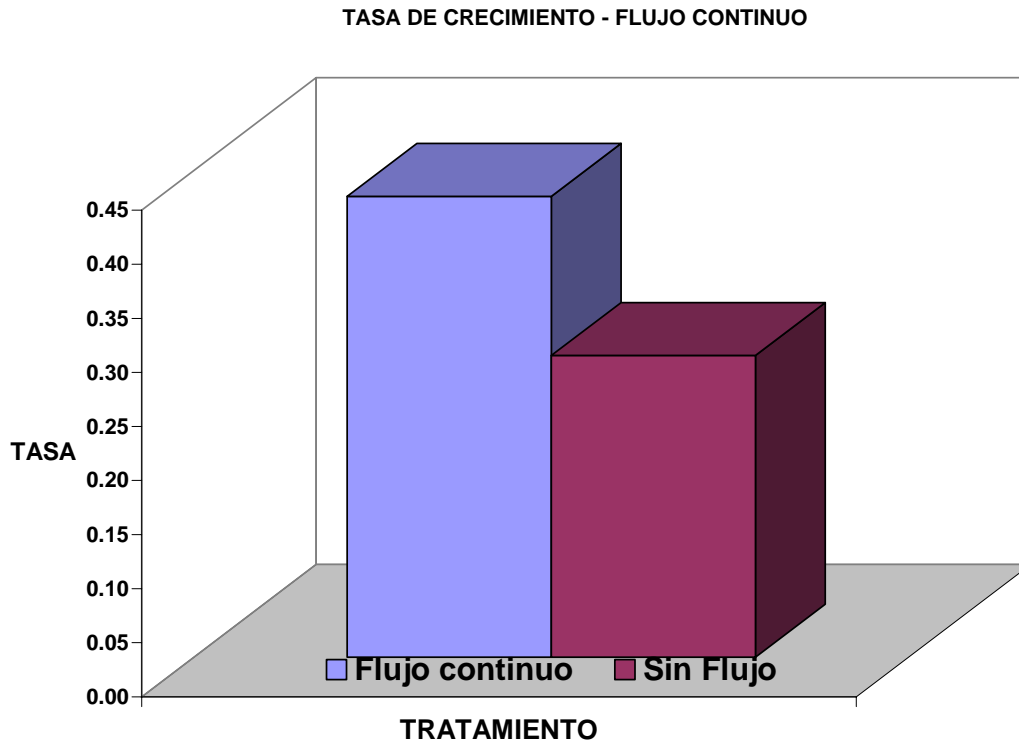


Fig. 73.- Tasa de crecimiento (K) en cada uno de los tanques en el experimento de flujo continuo.

#### 7.4 EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN 1.2 m<sup>3</sup>

A partir de una siembra inicial de  $252 \pm 21$  rotíferos/ml, durante la validación en 1200 l el cuarto día fue en el que se obtuvieron los mayores niveles  $1595 \pm 53$  rotíferos/ml (Fig. 74). El comportamiento de las replicas fue similar. La prueba de normalidad ( $P=0.156$ ) al igual que el análisis de varianza, indican que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.227$ ) entre las replicas. Existiendo una correlación entre el crecimiento en la densidad de rotíferos y los días de cultivo.

## Rotíferos por ml - VALIDACION 1200

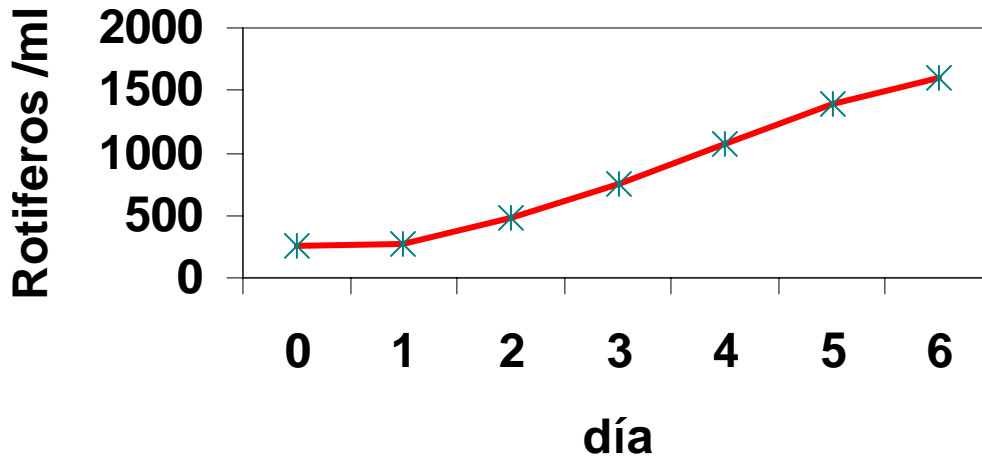


Fig. 74.- Densidad de rotíferos durante la validación en 1200 l.

En el índice de fecundidad y el porcentaje de hembras con huevos se apreció un comportamiento similar (Fig.75), El análisis de varianza indicó que no existe diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.200$ ) entre cada una de las replicas, en la fecundidad y en el porcentaje de hembras con huevo, teniendo los mejores resultados durante el primer día de cultivo.

Se detectó un incremento gradual en los niveles de amonio no ionizado en los cultivos masivos de rotíferos conforme pasaron los días (Fig. 76). No existiendo diferencias estadísticamente significativa ( $P \leq 0.200$ ) entre cada una de las replicas, los niveles de amonio no ionizado se mantuvieron dentro del rango optimo de operación siendo marcadamente menores durante los primeros días de cultivo.

En las tres replicas, el oxígeno disuelto se mantuvo de manera uniforme  $11.25 \pm 1.85$  ppm (Fig. 77) y dentro del intervalo adecuado (10-15 ppm oxigeno puro) a lo largo del tiempo y sin diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) entre las replicas.

El pH no presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P = >0.05$ ) entre las tres replicas, con valores de  $8.12 \pm .18$  manteniéndose dentro del intervalo óptimo 7.5 - 8.5 (Tabla 1) durante los días del cultivo (Fig. 78).

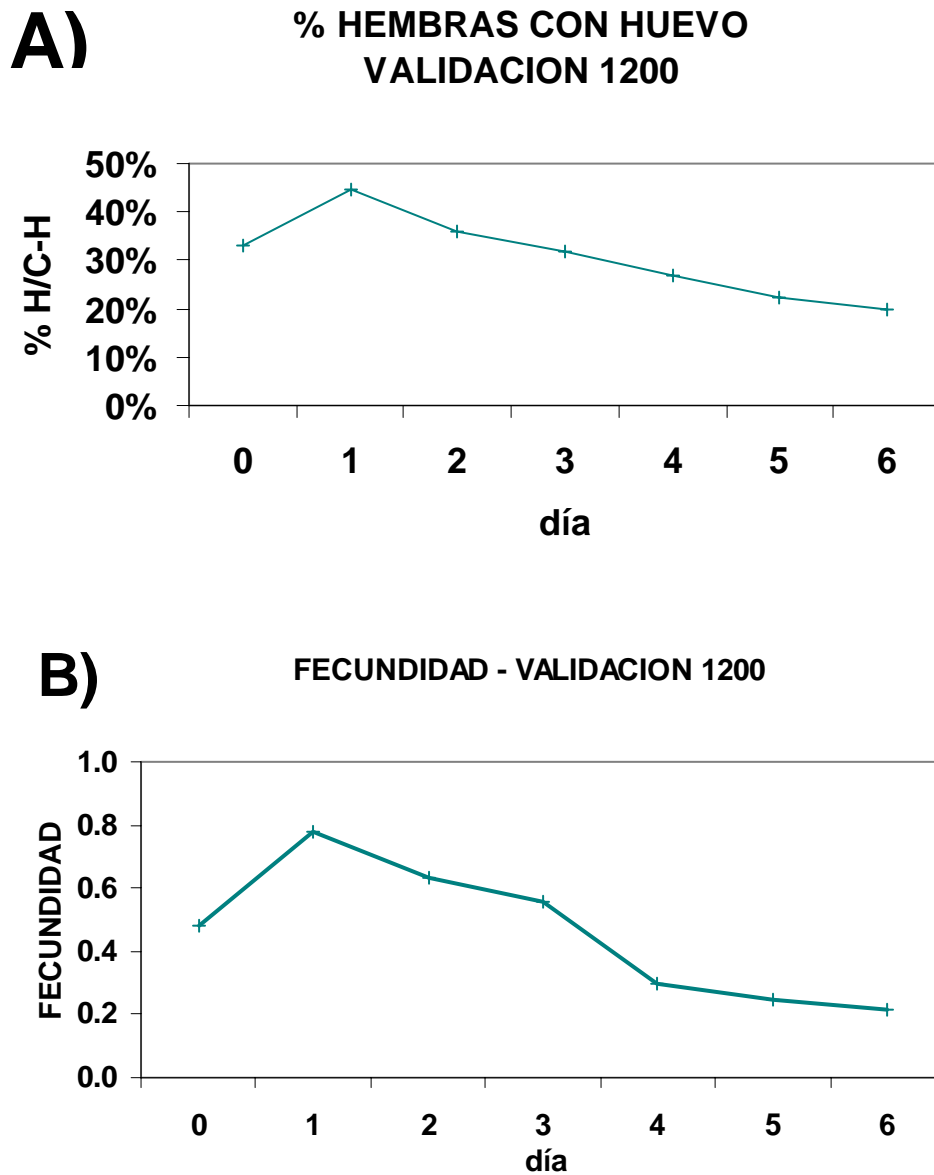


Fig. 75.- A) Hembras con huevos, B) Índice de fecundidad por mililitro a lo largo del tiempo en cada una de las replicas durante la validación en 1200 l.

### AMONIO - VALIDACION 1200

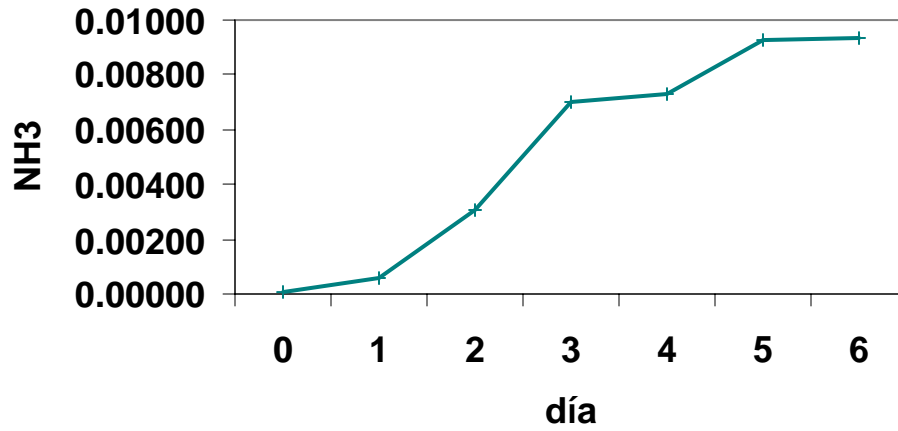


Fig. 76.- Concentración promedio de amonio no ionizado durante el cultivo de en cada en cada una de las replicas durante la validación en 1200 l.

### Oxigeno - VALIDACION 1200

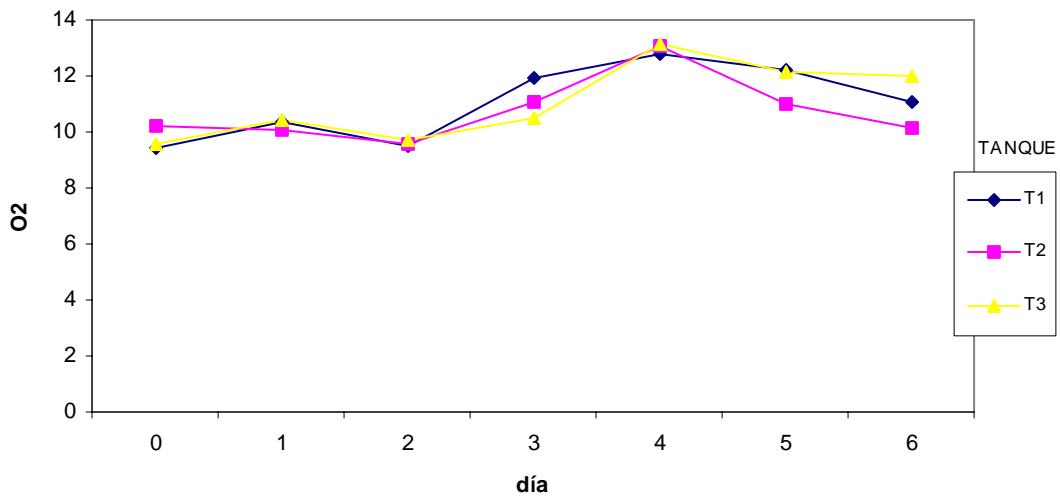


Fig. 77.- Concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo en cada en cada una de las replicas durante la validación en 1200 l.

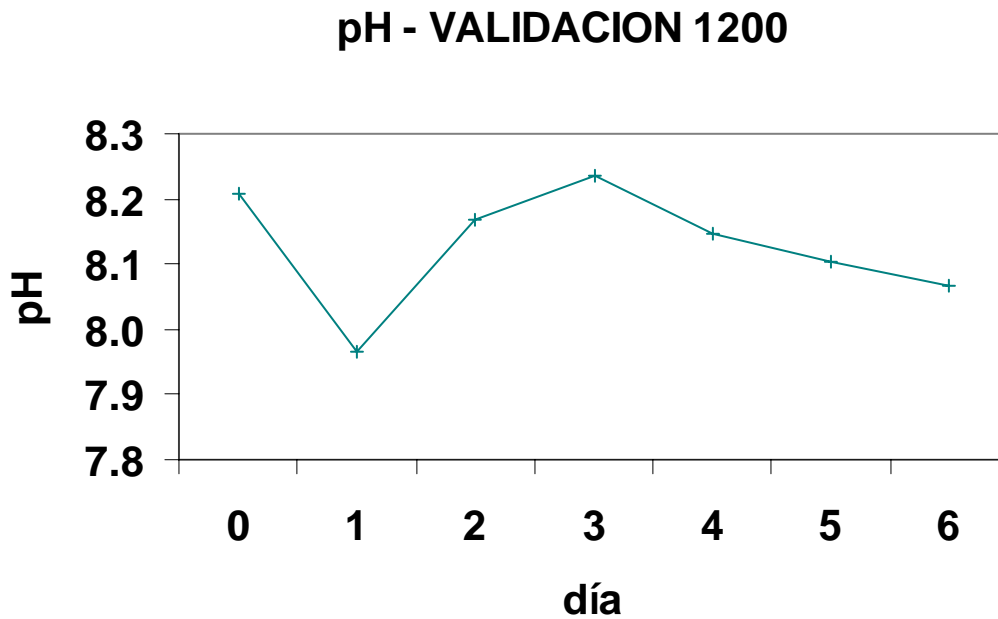


Fig. 78.- Valores de pH durante los experimentos con los tratamientos de alimento.

La temperatura se mantuvo estable, con máximas de  $24.5 \pm 0.5$  y mínimas de  $21.5 \pm 0.5$  durante los días de cultivo (Fig. 79).

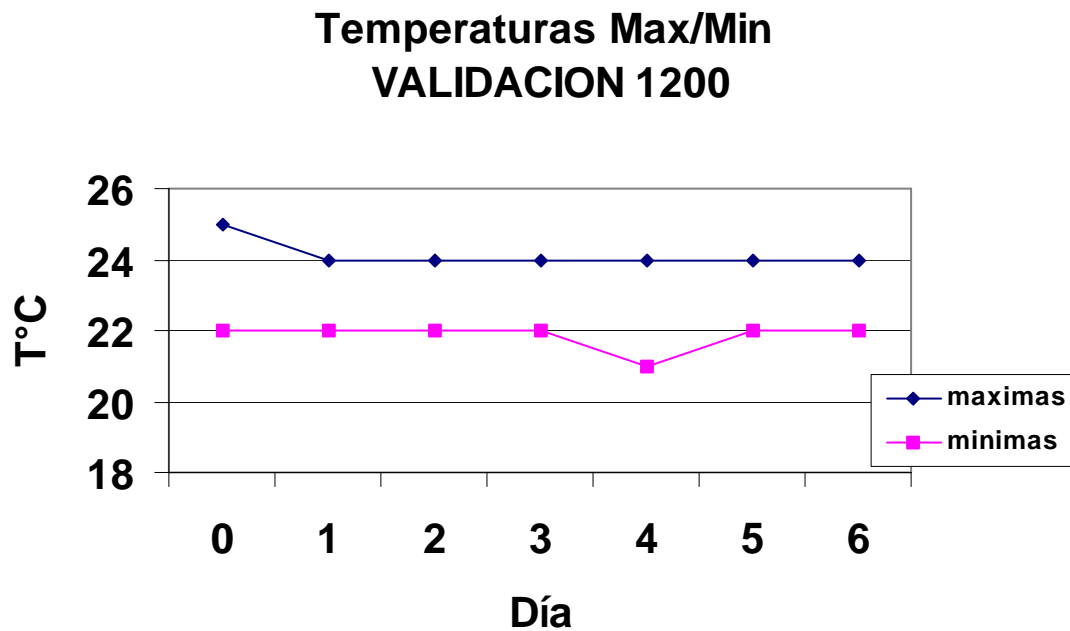


Fig. 79.- Temperaturas máximas y mínimas durante la validación en 1200 l.

La tasa de crecimiento fue de 0.36 en el cuarto día y  $26.5 \pm 0.5$  para los días 3 y 5 (Fig. 80), indica que el momento apto para el crecimiento de la población se encuentra en el cuarto día de cultivo.

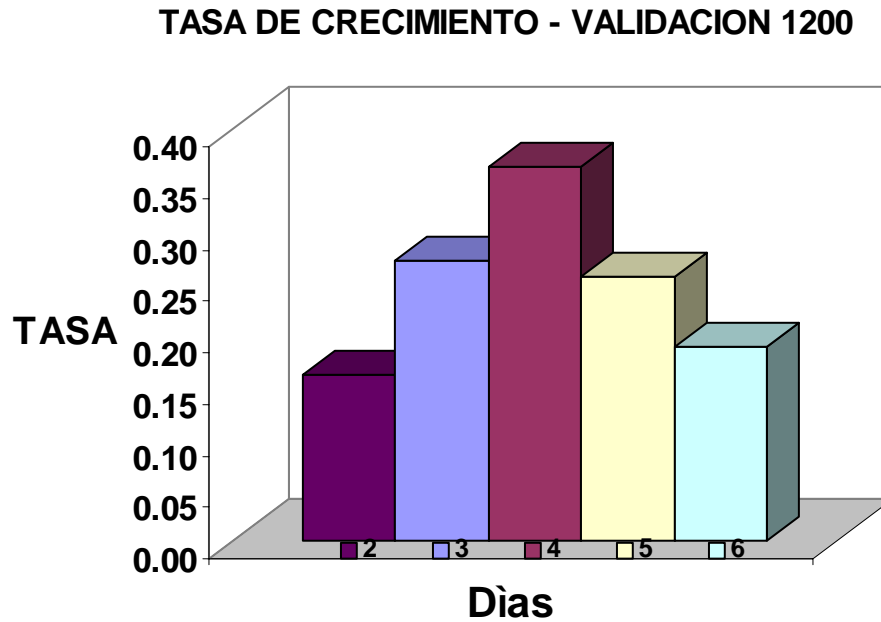


Fig. 80.- Tasa de crecimiento (K) en cada en cada una de las replicas durante la validación en 1200 l.

## 8. FACTIVILIDAD ECONOMICA

La comparación económica esta basada en la producción de inóculos con microalga y las diferentes opciones de producción intensiva tomando en cuenta las formas de suministro de oxígeno y los costos de los alimentos artificiales Selco Plus®, Selco 3000® y Ori-Culture®. Teniendo en cuenta que para poder realizar cualquier tipo de producción se necesita una infraestructura bien establecida con pasivos y activos económicos que no son considerados en el presente, incluyendo el salario del personal debidamente capacitado.



Tabla 12.- Costos de fertilizantes para microalgas.

<b>Fertilizantes para microalga</b>				
<b>Reactivo</b>	<b>venta</b>	<b>Costo</b>	<b>necesarios</b>	<b>Costo</b>
Nitrato de NH <sub>4</sub> o Na	500 g	\$198. <sup>00</sup> + IVA.	600 g	\$237.60 + IVA.
Superfosfato simple	500 g	\$120. <sup>00</sup> + IVA.	60 g	\$14.40 + IVA.
Cloruro Férrico	500 g	\$421.20 + IVA.	1 g	\$0.84 + IVA.
EDTA Sódico	25 kg	\$1529. <sup>00</sup> + IVA.	30 g	\$1.84 + IVA.
Oligoelementos ml/l	1 l	\$691.98 + IVA.	750 ml	\$518.99 + IVA.
	Inversión inicial	\$2,960.18 + IVA.	Costo para fertilizar 3000 l de agua.	\$773.67 + IVA.

Tabla 13.- Costos de reactivos para preparar Oligoelementos y Sales.

<b>Oligoelementos y Sales</b>				
<b>Reactivo</b>	<b>Venta</b>	<b>Costo</b>	<b>necesarios</b>	<b>Costo</b>
Sulfato de Zinc Crist. Zn SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	500 g	\$126. <sup>00</sup> + IVA.	50 g	\$12.60 + IVA.
Sulfato Cuprico CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	500 g	\$340. <sup>00</sup> + IVA.	50 g	\$34. <sup>00</sup> + IVA.
Sulfato de Cobalto CoSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	100 g	\$335. <sup>00</sup> + IVA.	50 g	\$167.50 + IVA.
Sulfato Manganeseo Monob MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	500 g	\$189. <sup>00</sup> + IVA.	50 g	\$18.90 + IVA.
Cloruro Ferrico FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	500 g	\$421.20+ IVA.	50 g	\$42.12+ IVA.
Molibdato de Sodio NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	100 g	\$319.50+ IVA.	50 g	\$159.75+ IVA.
EDTA Na <sub>2</sub> -EDTA	500 g	\$233.10+ IVA.	50 g	\$23.31+ IVA.
Cloruro de amonio NH <sub>4</sub> Cl	500 g	\$117. <sup>00</sup> + IVA.	50 g	\$11.70 + IVA.

		IVA.		IVA.
Fosfato de potasio monobásico $\text{KH}_2\text{PO}_4$	500 g	\$169.00 + IVA.	50 g	\$16.90 + IVA.
Nitrato de Sodio $\text{NaNO}_3$	500 g	\$205.20+ IVA.	500 g	\$205.20+ IVA.
	Inversión inicial.	\$2,455.00+ IVA	Para 1 l	\$691.98 + IVA.

Tabla 14.- Costos de producción de inóculos  $250 \times 10^6$  rotíferos.

<b>Producción de inóculos <math>250 \times 10^6</math> rotíferos</b>	
Cultivo con microalga	
CONCEPTO	COSTO
1 000 litros de microalga inóculos menores (oligoelementos y sales 1l).	\$691.98 + IVA.
3 000 litros de microalga inóculos mayores.	\$773.67 + IVA.
<b>TOTAL:</b>	<b>\$1,465.65 +IVA.</b>

El uso del oxígeno puro de manera intermitente y con un regulador conectado de manera independiente a un medidor de flujo es ineficiente y genera la pérdida de hasta un 50% del oxígeno. Existe un regulador-flujómetro que hace más eficiente el uso de oxígeno puro. (Ing. Oswaldo Toledo, Praxair S.A. de C.V., 2007, comunicación personal).

Para garantizar y mantener los tanques con una concentración de 10 a 15 ppm, el flujo de  $\text{O}_2$  utilizado en la validación de  $1.2 \text{ m}^2$  fue de 0.25 a 0.30 l/min por difusor. Cada tanque de  $1.2 \text{ m}^3$  contaba con cinco difusores con un consumo de 1.25-1.50 l/min/ $\text{m}^3$ . Considerando el día cero y la cosecha, en 5 días el consumo fue de 9000 a 10,800 l/ $\text{m}^3$ .

En los centros piloto y comerciales de producción de juveniles de peces marinos, se aplican dos variantes para el oxígeno, o bien cilindros con oxígeno puro, o bien equipos generadores de oxígeno. Tres de los equipos encontrados son:

-Uno con capacidad de producción de oxígeno de 5 l/min a 1 atm, a un costo aproximado de \$15,000 a \$20,000.

-Uno con capacidad de 2 l/min a 1 atm tiene un costo aproximado de \$80,000.

-Uno con un sistema especial de producción y difusión de oxígeno, con capacidad de 12 l/min a 1 atm tiene un costo aproximado de \$140,000. El consumo eléctrico de este equipo es de 0.15 kW-h. Dado el sistema de difusión que tiene este equipo, el resultado prácticamente es como si produjera 20 l/min, por lo que este equipo puede abastecer 12 tanques de 1.2 m<sup>3</sup> y en ese caso, se utilizará el costo de una cuarta parte del consumo de electricidad

Llenado de cilindros de:

9500 l por \$609 + IVA

7000 l por \$435 + IVA

45000 l por \$2,855 + IVA

Tabla 15.- Costos de insumos para la Producción intensiva de rotíferos.

<b>Insumos para la producción intensiva de rotíferos</b>	
<b>INSUMO</b>	<b>COSTO</b>
Ori-Culture® Kg	80.ºº US + IVA.
Selco 3000® Kg	36.70 US + IVA.
Selco Plus® Kg	19.19 US + IVA.
Renta de Generador de O <sub>2</sub> puro	100.ºº + IVA.
Recarga de cilindro de O <sub>2</sub> puro de 45000 l.	\$2,855.ºº + IVA.
Recarga de cilindro de 9500 l O <sub>2</sub> puro	\$609.ºº + IVA.
Consumo eléctrico del generador de O <sub>2</sub> puro	\$4.50 + IVA

Amortización anual del generador de O <sub>2</sub>	\$1,400
Caja de Fibra “Scotch Bright” 48 tiras de 72.5 x 9.3 cm	\$625. <sup>00</sup> + IVA.

Tasa de cambio del dólar estadounidense: C \$10.28 | V \$10.58 (martes 6 mayo 2008).

Se debe tomar en cuenta que los productos que se venden en dólares están sujetos a la tasa de cambio.

Tabla 16.- Alternativas de costos de producción intensiva de rotíferos (en pesos).

<b>Producción de 1.2 x 10<sup>9</sup> rotíferos a partir de inóculos de 250 rotíferos/ml</b>			
Cultivo con Selco Plus®.		Cultivo con Selco 3000®.	
CONCEPTO	COSTO	CONCEPTO	COSTO
Producción de inóculos	\$1,465.65+IVA	Producción de inóculos	\$1,465.65+IVA
655 g Selco Plus®	\$177.75 + IVA.	655 g Selco 3000®	\$259.21 + IVA.
1 cilindro de 9500 l O <sub>2</sub> puro	\$609. <sup>00</sup> + IVA.	1 cilindro de 9500 l O <sub>2</sub> puro	\$609. <sup>00</sup> + IVA.
Fibra “Scotch Bright”	\$156.25 + IVA.	Fibra “Scotch Bright”	\$156.25 + IVA.
<b>TOTAL:</b>	<b>\$2,408.65 + IVA</b>	<b>TOTAL:</b>	<b>\$2,490.11 + IVA</b>
CONCEPTO	COSTO	CONCEPTO	COSTO
Producción de inóculos	\$1,465.65+IVA	Producción de inóculos	\$1,465.65+IVA
655 g Selco Plus®	\$177.75 + IVA.	655 g Selco 3000®	\$259.21 + IVA.
O <sub>2</sub> puro de tanque de 45000 l	\$602.30+ IVA.	O <sub>2</sub> puro de tanque	\$602.30 + IVA.
Fibra “Scotch Bright”	\$156.25 + IVA.	Fibra “Scotch Bright”	\$156.25 + IVA.
<b>TOTAL:</b>	<b>\$2,401.95 + IVA</b>	<b>TOTAL:</b>	<b>\$2,483.41 + IVA</b>
CONCEPTO	COSTO	CONCEPTO	COSTO
Producción de inóculos	\$1,465.65+IVA	Producción de inóculos	\$1,465.65+IVA
655 g Selco Plus®	\$177.75 + IVA.	655 g Selco 3000®	\$259.21 + IVA.

Amortización del oxigenador	\$ 20.00	Amortización del oxigenador	\$ 20.00
Fibra “Scotch Bright”	\$156.25 + IVA.	Fibra “Scotch Bright”	\$156.25 + IVA.
<b>TOTAL:</b>	<b>\$1,819.65 + IVA</b>	<b>TOTAL:</b>	<b>\$1,901.11 + IVA</b>

Cultivo con Ori-Culture®.	
CONCEPTO	COSTO
Producción de inóculos	\$1,465.65+IVA
540 g Ori-Culture®	\$457.06 + IVA.
Fibra “Scotch Bright”	\$156.25 + IVA.
<b>TOTAL:</b>	<b>\$2,078.96 + IVA</b>

El alimento artificial Ori-Culture® (no utiliza oxígeno puro) resultó ser efectivo cuando no se tiene acceso al uso de oxígeno puro, teniendo un menor incremento de amonio durante los primeros días. Las ventajas se ven reflejadas en los costos operacionales ya que con un gasto del 86% (\$1,901 tabla 16) de lo que cuesta la producción con Selco Plus® y el gasto del oxigenador, se logra obtener un 92% de la producción en el mismo tiempo con Ori-Culture®, y queda a criterio del productor el utilizar Selco Plus® u Ori-Culture®.



## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 TRABAJOS PREVIOS AL CULTIVO INTENSIVO

Es de vital importancia el aprender a confrontar y solucionar las dificultades mas frecuentes especialmente por contaminaciones bacterianas y de ciliados, tomando las medidas adecuadas para mantener las cadenas de producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* paralelamente al cultivo de los rotíferos.

Previo al montaje de los cultivos intensivos fue de suma importancia comprobar que las especies químicas presentes en el agua marina no afectan la determinación del amonio por medio del equipo pH PLUSDIRECT Meter (la Mote pH PLUS Direct 1936), garantizando una correcta medición del amonio no ionizado que es el compuesto nitrogenado más dañino que se produce por la descomposición bacteriana de la materia orgánica y de la excreción de organismos heterótrofos. Existiendo una correlación entre altas concentraciones de éste y bajas densidades de rotíferos en los cultivos masivos.

En cuanto a los trabajos de limpieza y desinfección, el poder trabajar con instalaciones y calidad de agua adecuadas, así como el acceso al uso de equipo como: lámpara de luz ultravioleta (VH-9282L) de flujo continuo, filtros de arena y de cartuchos múltiples de 16  $\mu\text{m}$  de retención relativa, cartuchos de 10 $\mu\text{m}$ , tratamiento del agua a utilizar con hipoclorito de sodio comercial según las técnicas establecidas (Moretti et al., 1999). El contar con material de limpieza (escobas, cepillos, trapeadores, fibras, entre otros) individualizado y desinfectado, es la base del éxito de los cultivos intensivos de rotíferos.

La alimentación de rotíferos con microalgas se realizó de dos formas que resultaron efectivas:

1°- Sembrando >10 rotíferos/ml en tanques que contenían microalgas a densidades de 10-30x10<sup>6</sup> células/ml.

2°- Transportando la microalga a través de bombas sumergibles a los tanques con rotíferos.

Otras medidas de control para conocer el estado de los cultivos de rotíferos es el número de huevos que portan las hembras y la conducta de locomoción. En el primer caso, la observación de hembras con dos o más huevos es indicativo de un cultivo en buen estado; la aplicación de la vitamina B-12 (0.002 mg/ml de cultivo), es una medida que resulta muy efectiva para lograr una alta fecundidad. Si la natación tiene una apariencia perezosa en comparación con un cultivo saludable, es probable que haya un estrés fisiológico que producirá una disminución en la fecundidad.

## **9.2 INFLUENCIA DEL USO DE OXIGENO PURO**

El uso del oxígeno puro de forma constante y dentro del intervalo óptimo 10 a 15 ppm (Tabla 1) mejora en gran medida la densidad de los cultivos, la fecundidad y el % de hembras con huevo; los niveles de amonio no ionizado son bajos y la tasa de crecimiento alta.

Los beneficios por el uso de oxígeno puro en los cultivos de rotíferos son múltiples y de gran utilidad en las producciones con altas densidades de rotíferos, reduciendo el mantenimiento y espacio.

El uso constante del oxígeno puro en los cultivos intensivos de rotíferos, además de mantener los niveles adecuados de oxígeno disuelto, disminuyeron los niveles de materia orgánica, los de amonio no ionizado, los bacterianos y como resultado general aumento la densidad del cultivo, tanto con sistemas de recirculación como abiertos (Suantika, et al., 2003a,b).

El oxígeno puro es un factor que tiene influencia clara sobre la producción de rotíferos a lo largo del tiempo, como se demostró en el experimento No. 1. Estas densidades concuerdan con las propuestas por Dhert (1996) con el uso del Culture Selco.

El comportamiento de los otros parámetros ambientales en el experimento de oxígeno puro mostró que la temperatura se mantuvo estable durante el experimento, en un intervalo mas bien bajo respecto a los mejores valores para los rotíferos (Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001). El pH presentó diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento de oxígeno puro, manteniéndose en el intervalo de valores que se considera



adecuado para los rotíferos. La diferencia en el primer día fue notoria y posiblemente estuvo dada por un aumento de los niveles de metabolitos que causan disminución del pH. El amonio no ionizado se encontró igualmente afectado, con valores significativamente inferiores con el uso de oxígeno puro, al igual que en otros tratamientos en que se tuvieron diferencias significativas.

Dada la influencia negativa en los cultivos de rotíferos que ha sido demostrada respecto a los altos niveles de amonio no ionizado y los bajos niveles de oxígeno disuelto (Fulk y Main, 1991; Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001; Lutzens y Zmora, 2003), para asegurar un buen desempeño de los cultivos de rotíferos que se benefician con el uso de oxígeno puro, es muy importante tomar medidas preventivas que aseguren que los niveles de amonio no ionizado y de oxígeno permanezcan en los intervalos adecuados. También es conocido que el suministro de oxígeno en acuicultura disminuye los niveles de amonio (Huguenin y Colt, 1989), por lo cual se comprueba que medidas que tiendan a mantener estos dos parámetros en los niveles controlados, beneficiarán los cultivos de rotíferos.

Se demuestra una vez más que el oxígeno uno de los elementos más importantes de la química orgánica por participar de forma muy importante en el ciclo energético de los seres vivos, es el soporte del proceso de “combustión vital” que mantiene la vida, esencial en la respiración celular de los organismos aeróbicos. Siendo los rotíferos organismos aerobios al tener las cantidades adecuadas de oxígeno logran transformar los carbohidratos, grasas y proteínas de sus dietas en calor, energía, vida y reproducción. Además el oxígeno en mayor cantidad favorece la eliminación de las toxinas en los cultivos intensivos. Cuanto más oxígeno se tiene en los sistemas, más energía se produce. Las altas concentraciones de oxígeno puro, reducen el estrés y aumentan la concentración y estado de alerta. Si de algún modo se restringe el suministro de oxígeno se tendrá una repercusión negativa sobre la tasa de crecimiento de los cultivos.

### **9.3 USO DE SISTEMAS DE FILTRADO EN BANDA (Fibra “Scotch Bright”) PARA LA COLECTA DE MATERIA ORGÁNICA**

El efecto de los filtros de materia orgánica (Fibra “Scotch Bright”) fue notorio en el segundo día, cuando se detectó un incremento importante en el amonio no ionizado en los cultivos masivos de rotíferos sin filtros. En el tratamiento con filtro (Fibra “Scotch Bright”) se obtuvieron los mayores niveles ( $763\pm 150$ ) de rotíferos/ml presentando concentraciones de amonio no ionizado durante los días de cultivo marcadamente estables y menores. Con una tasa de crecimiento mayor demostrando que los filtros utilizados influyeron positivamente en el crecimiento de la población.

El porcentaje de hembras con huevo, fecundidad y densidad aunque no muestran diferencias estadísticas significativas se logran distinguir en los gráficos diferencias sutiles que permiten a los cultivos estar en mejor estado, estas diferencias estadísticas sutiles son evidentes visualmente (Fig. 81) estas pequeñas diferencias son la diferencia entre el éxito y el fracaso de los cultivos.

Los filtros son muy necesarios a partir de densidades de más de 200 - 500 rotíferos/ml, debido a que la materia orgánica eleva la carga bacteriana, disminuye mucho el pH y el oxígeno, aumentando los niveles de amonio, especialmente el no ionizado que es la forma más tóxica en cultivos que se mantienen con alimentos artificiales.

### **9.4 USO DE UN SISTEMA FILTRO TIPO “AIR-LIFT” PARA LA COLECTA DE MATERIA ORGÁNICA**

Conforme transcurren los días del cultivo, los desechos orgánicos se acumulan y junto con la población de rotíferos aumenta la materia orgánica, el tratamiento con filtros de elevación por aire (tipo “air-lift” en inglés) que se probó para la colecta de materia orgánica en los cultivos fue adecuado. La densidad del cultivo aumento desde el primer día en comparación con los cultivos en que no se incluyó el sistema de colecta de materia orgánica, en ambos casos la densidad disminuyó por el deterioro ambiental.

Es importante destacar que el tratamiento con los filtros para la captación de materia orgánica tuvo menores niveles de amonio no ionizado como era previsible, al disminuir la materia orgánica en el agua. Por ello se recomienda aplicar este método para eliminar el exceso de materia orgánica de los cultivos, por que los alimentos artificiales e incremento de la población, aumentan los niveles de amonio y disminuyen los niveles de oxígeno disuelto, lo cual ha sido demostrado (Fulk y Main, 1991; Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001; Stottrup y McEvoy 2003) y también recomendado por los fabricantes de los alimentos preparados para los cultivos intensivos de rotíferos (INVE Aquaculture Inc.).

## **9.5 USO DE BOMBAS PERISTÁLTICAS COMO ALIMENTADORES**

Las densidades que se alcanzaron en el tratamiento con el uso de bombas peristálticas (alimentadores) fueron significativamente superiores a las alcanzadas con la aplicación del alimento en tres porciones, se demostró que para el buen desarrollo del cultivo por lotes, uno de los requisitos es suministrar el alimento artificial de manera gradual. Debido a que al agregar demasiada materia orgánica en un lapso muy corto de tiempo, produce estrés que eleva la carga bacteriana, disminuye mucho el pH y el oxígeno y aumenta los niveles de amonio, especialmente el no ionizado que es la forma más tóxica, existe una correlación entre altas concentraciones de éste y bajas densidades de rotíferos en los cultivos masivos, el amonio libre también afecta la producción de huevos, con lo que se reduce el crecimiento de la población y la actividad natatoria, a partir del segundo día se detectó un incremento importante en el amonio no ionizado en los cultivos masivos de rotíferos sin alimentador mientras que en el tratamiento con alimentador, las concentraciones de amonio no ionizado durante los días de cultivo fueron marcadamente menores.

Los índices de fecundidad y porcentaje de hembras con huevo tienen un comportamiento similar y dependen de la cantidad de rotíferos en el cultivo, aumentando o disminuyendo en proporción a la población indicando la fase en que se encuentran los cultivos: exponencial, estacionaria o en declinación y normalmente > 30% de los rotíferos deben llevar huevos 24 h después de la iniciar el cultivo (Tamaru *et al.*, 1993a), un cultivo con hembras que presentan mas de dos huevos y una buena actividad es un cultivo en buenas condiciones.

Con filtros



Sin filtros



Fig. 81.- Comparativo fotográfico del uso de filtros.

En el experimento se observaron diferencias en la fecundidad entre los dos métodos de alimentación, sin embargo, en ambas la fecundidad presentó una disminución a partir del tercer día del experimento, lo cual afectó las posibilidades de crecimiento poblacional, el cual declinó la tasa de incremento en el tratamiento sin alimentadores y ello se reflejó con poco incremento de la densidad durante los días de cultivo

Por lo tanto es importante desarrollar métodos que aseguren que los parámetros ambientales se mantengan en los intervalos adecuados, especialmente el amonio no ionizado y el oxígeno, de tal forma que la aplicación del alimento de manera gradual logran que el cultivo se deteriore en menor medida como se puede apreciar en los niveles de amonio.

Se ha demostrado que la densidad de la siembra es uno de los parámetros más importantes en los cultivos de alimento vivo (Fulk y Main, 1991; Alvarez-Lajonchère y Hernández Molejón, 2001; Stottrup y McEvoy 2003) sin embargo en el experimento de alimentadores donde la siembra inicial fue de  $418 \pm 25$  la densidad alcanzada y la tasa de crecimiento no fue de las mejores con respecto a los otros experimentos por lo que se recomienda iniciar los cultivos con 250 rotíferos/ml.

La tasa de crecimiento fue significativamente mas alta en el tratamiento con alimentador, lo cual indica la importancia de utilizar las bombas peristálticas como alimentadores dada su influencia positiva en el crecimiento de la población.

## **9.6 DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTO**

En los dos experimentos en que se probaron diferentes alimentos (Selco Plus®, Ori-Culture® y Selco 3000®) las replicas con Selco Plus® fueron las que obtuvieron los mayores niveles de rotíferos/ml.

En el índice de fecundidad y el porcentaje de hembras con huevos se vieron beneficiados con el uso de Selco Plus® en ambos experimentos.

En el caso de Ori-Culture® no se suministró oxígeno puro y los niveles se mantuvieron de manera uniforme y dentro del intervalo adecuado (5-7 ppm con aeración). El tratamiento con Selco Plus® tubo los mejores resultados de oxígeno puro con una diferencia estadísticamente significativa.

El pH dentro del intervalo óptimo (Tabla 1) en los tres alimentos y una tasa de crecimiento muy favorable para el caso de Selco Plus®.

En el caso del amonio este tubo menores concentraciones en el tratamiento de Selco Plus® experimento de Selco Plus® contra Selco 3000®, y para el caso de Ori-Culture® en el experimento seis.

### **9.7 FLUJO CONTINUO DE AGUA**

El tratamiento con flujo continuo fue de todos los experimentos el que obtuvo los mejores niveles de cosecha  $1380 \pm 12$  rotíferos/ml en cuatro días a partir de una siembra inicial de  $251 \pm 43$  rotíferos/ml, con mejorías significativas el índice de fecundidad, el porcentaje de hembras con huevos y la tasa de crecimiento con menores incrementos en los niveles de amonio no ionizado.

La densidad que alcancen los cultivos de rotíferos con las técnicas de cultivo por lotes dependen de las condiciones ambientales y la alimentación, si se mejora la calidad del agua por renovación (circulación abierta), disminuye el estrés de la población que aumenta con las altas densidades y el recambio de agua beneficia la tasa de crecimiento, entre otros factores, como se pudo apreciar en el experimento.

Los buenos resultados en este experimento se deben a que con el flujo continuo del agua los niveles de amonio no ionizado son significativamente menores dentro del tanque. El amonio no ionizado ( $\text{NH}_3$ ) es el factor más perjudicial para los cultivos de zooplancton (tanto rotíferos como copépodos) y con la circulación permanente del agua, se garantiza que disminuyan dentro del tanque aquellos agentes que favorecen la formación de  $\text{NH}_3$  como la descomposición bacteriana de la materia orgánica, las excretas y los metabolitos de los propios rotíferos, parte de los cuales se disuelven como  $\text{NH}_4$  y está en dependencia de la temperatura, la salinidad y el pH del medio se convierten en  $\text{NH}_3$ . Con la circulación del agua de forma permanente se asegura un medio de cultivo más limpio y por ende menos nocivo para los organismos, dando así mejores resultados.

## **9.8 EXPERIENCIA DE PRODUCCIÓN MASIVA DE ROTÍFEROS EN TANQUES DE 1200 l.**

Durante la validación en 1200 l se obtuvieron concentraciones altas  $1595 \pm 53$  rotíferos/ml al cuarto día de cultivo, controlando y manteniendo los niveles óptimos de los factores físico químicos (Tabla 1) como se demostró durante el experimento de flujo continuo de agua, se mantuvo un alto índice de fecundidad, un buen porcentaje de hembras con huevos y una tasa de crecimiento alta con bajos incrementos en los niveles de amonio no ionizado.

La tasa de crecimiento muestra claramente alcanzar su máximo durante el cuarto día, indicando ser el momento ideal para la cosecha parcial o total, dependiendo de las necesidades y demanda de alimento vivo.

El incremento en los niveles de amonio no ionizado fue gradual conforme pasaron los días de cultivo manteniéndose todo el tiempo dentro del rango óptimo de operación siendo marcadamente menores durante los primeros días de cultivo.

En los centros comerciales de producción de juveniles de peces marinos, las producciones intensivas de rotíferos habitualmente están alrededor de 1,000 a 2,000 rotíferos/ml en tanques de 500 a 1,000 litros (Moretti et al., 1999; Alvarez-Lajonchere y Hernández Molejón, 2001; Schipp et al., 2007), por lo que las concentraciones obtenidas en la experiencia de producción masiva con tanques de 1,200 l se encuentra centrada en dicho intervalo.

## **9.9 ANÁLISIS DE COSTO-BENEFICIO**

En primera instancia se tomaron los costos de los insumos necesarios para lograr la producción de  $1.2 \times 10^9$  rotíferos, que fueron estimados en alrededor de \$1,901 + I.V. A lo que equivale a \$1.82/10<sup>6</sup> rotíferos (moneda nacional) en cuatro días de cultivo intensivo, con diferentes tipos de alimento y sus adecuaciones técnicas. Es de suma importancia cuidar las pérdidas de oxígeno garantizando que los tanques de cultivo se mantengan a una concentración de 10 a 15 ppm.

Estos rendimientos se comparan ventajosamente con los reportes del costo de producción de rotíferos con el sistema tradicional por lotes con microalgas y levadura, que son de

aproximadamente US\$ 0.60/10<sup>6</sup> rotíferos (\$6.30 en moneda nacional), en los centros del Mediterráneo (Candrea et al., 1996); sin embargo, la eficiencia lograda en los sistemas superintensivos con Culture Selco con recirculación es de unas tres veces superior a la alcanzada en estas primeras pruebas del presente estudio, pues logran costos estimados de US\$ 0.06/10<sup>6</sup> rotíferos (\$0.63) (Suantika et al., 2003b).

## 9.10 METAS Y LOGROS

El principal aporte del presente estudio se encuentra en el incremento las densidades que se pueden lograr en los cultivos de rotíferos en cuatro días de cultivo respecto a las alcanzadas anteriormente en las instalaciones del CIAD cuyas producciones más altas del cultivo masivo de rotíferos *B. rotundiformis* habían sido de 140 rotíferos/ml entre el tercer y cuarto día de cultivo con microalga por Velasco y Duncan (2002), 334 rotíferos/ml con *Nannochloropsis oculata* y 300 rotíferos/ml con Culture Selco 3000® en ocho días de cultivo por Guzmán (2004) y 565 rotíferos/ml a una salinidad de 25‰ en cuatro días con Culture Selco 3000® por Sánchez (2006). Durante el presente trabajo se obtuvieron niveles de 1380±12 rotíferos/ml a partir de una siembra inicial de 251±43 rotíferos/ml. El conocimiento adquirido respecto a los comportamientos de los parámetros ambientales sobre los cultivos y los avances respecto a las técnicas aplicadas para la colecta de materia orgánica e incremento del oxígeno disuelto, permitieron mejorar las técnicas de producción de rotíferos de la especie *Brachionus rotundiformis* mediante la administración de O<sub>2</sub> puro, equipos y técnicas de cultivo intensivo bajo las condiciones del área Piloto del CIAD Unidad Mazatlán. No obstante, queda mucho por hacer puesto que existen cultivos a altas densidades que utilizan recirculación de agua y logrando producciones de 2,800 y hasta 8,000 rotíferos/ml con Culture Selco Plus® en 11 días (Dhert y Sorgeloos 1999) o incluso cultivos muy intensivos con densidades de hasta 7,000 rotíferos/ml y producciones diarias de más de 2,500 rotíferos/ml durante tres semanas (Suantika et al 2003a,b) o los ultra-densos de hasta 1.6 x 10<sup>5</sup> rotíferos/mL (Yoshimura et al 2003).



## 10. CONCLUSIONES

1. El método de suministro de oxígeno puro utilizado en el presente estudio fue adecuado para obtener altas densidades de rotíferos ( $>1,000$  rotíferos/ml) en los cultivos.
2. Una buena calidad de agua desde el bombeo, su correcto almacenamiento y el mantenimiento de los sistemas de distribución garantiza un cultivo saludable.
3. Conforme se avanzó en los experimentos las densidades de cosecha aumentaron, debido a la integración de las mejoras en las técnicas.
4. El uso de filtros para la colecta de materia orgánica en los cultivos intensivos de rotíferos es uno de los aspectos prioritarios para mejorar la calidad del agua y facilitar el crecimiento del cultivo de rotíferos.
5. Las bombas peristálticas como dosificadores de alimento resultaron muy efectivas mejorando las condiciones de los cultivos.
6. De los tres alimentos formulados probados, el Selco Plus® resultó ser el más efectivo, sin embargo debe evaluarse que en el caso de Ori-Culture® no se suministro oxígeno puro y los niveles se mantuvieron de manera uniforme y dentro del intervalo adecuado (5-7 ppm con aeración). Por lo que resulta ser efectivo cuando no se tiene acceso al uso de oxígeno puro, por tener un menor incremento de amonio durante los primeros días.
7. Las densidades que se alcanzaron en el tratamiento con flujo continuo de agua fueron significativamente superiores a las alcanzadas con el resto de los experimentos, esto demostró que para alcanzar altas densidades en el cultivo por lotes, uno de los requisitos más importantes es tener un agua limpia con alimento suficiente.
8. Producciones con altas densidades de rotíferos, reducen los gastos de mantenimiento y optimizan el espacio.

9. Las instalaciones como el equipamiento, deben cumplir con las especificaciones mínimas requeridas, el correcto funcionamiento y mantenimiento éstos garantiza el desarrollo adecuado de los cultivos de rotíferos.
10. Los índices de fecundidad y porcentaje de hembras con huevos tienen el mismo comportamiento y deben ser utilizados con reserva para interpretar el estado del cultivo.
11. Un buen indicador de un cultivo en excelentes condiciones es la presencia de hembras con dos o más huevos y una buena actividad natatoria.
12. Para alcanzar densidades altas en el cultivo de rotíferos es importante utilizar altas densidades de siembra; sin embargo, densidades muy altas (>300 rotíferos/ml) pueden provocar que la tasa de crecimiento no sea la mejor.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Tener especial cuidado con el correcto uso del oxígeno puro, las fugas en este sistema resultan peligrosas y tienen un alto costo.
2. Evitar que la calidad del agua se deteriore durante el desarrollo del cultivo; manteniendo bajos niveles de amonio no ionizado, altos niveles de oxígeno disuelto y controlar el pH con valores altos dentro del intervalo adecuado. Sea por filtros biológicos o recambio durante el desarrollo de los cultivos intensivos alimentados con alimentos artificiales, se recomiendan cosechas parciales durante el tercer y cuarto día de cultivo y de manera total al primer indicio de colapso, poniendo especial cuidado en el incremento en el amonio no ionizado y utilizando la tasa de crecimiento como indicador como se puede observar en la validación de 1200 l (Fig. 80).
3. Buscar tratamientos correctivos de manera rápida para aplicarse cuando el amonio no ionizado  $\text{NH}_3$  se encuentre cerca de los niveles no permisibles.
4. Separar unos 15 cm los difusores del fondo del tanque para que se facilite la sedimentación de los desechos y utilizar tanques cilindro-cónicos para eliminar los sedimentos que se acumulen en el cono en varias ocasiones al día.
5. Agregar cada 24 hrs 0.002 mg de vitamina B-12 por mililitro de agua para mantener altos los niveles de fecundidad.
6. Instalar sistemas de temperatura controlada en los cultivos.
7. Realizar trabajos encaminados a la obtención de rotíferos lo más pequeño posible para ser utilizados como primer alimento de las larvas de organismos marinos con bocas muy pequeñas: a) pruebas de tamizado con mallas pequeñas; b) trabajos con una cepa muy pequeña (tipo “SS”) del rotífero *B. rotundiformis*; c) producción y utilización de huevos durmientes para la producción masiva de neonatos.
8. Evaluar la factibilidad del uso del alimento artificial Ori-Culture® que aun que no tiene el mismo efecto que Selco Plus® en el crecimiento de la población representa un ahorro importante en el gasto de oxígeno puro.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>PUFA</b>	Ácidos grasos polinsaturados
<b>ARA</b>	Ácido araquidónico
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenoico
<b>CIAD</b>	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

## 12. REFERENCIAS

- Alvarez-Lajonchère, L., Hernández-Molejón, O. G. 2001. Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: diseño, operación y tecnologías. The World Aquaculture Society, Baton Rouge; LA, 424.
- Alvarez-Lajonchère, L., Hernández Molejón, O. G. 1994. Manual de Técnicas para la Producción Piloto de Juveniles de Peces Marinos. Villa Hermosa, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 102.
- Alvarez-Lajonchère, L., Hernández Molejón, O. G., Pérez Sánchez, L. 1991 Producción de juveniles de la liza *Mugil liza* Valenciennes, 1836, por producción controlada en Cuba. Ciencias Marinas 17 : 47-56.
- Bernabé. 1991. Acuicultura Tomo 1. Ediciones Omega S.A. Barcelona.
- Beveridge. 1996. Aquaculture. Fishing News Books. United Kingdom.
- Borowitzka, M. A. 1999. Production of microalgal concentrates for aquaculture (Part 1: Algae Culture). Final Report to the Fisheries Research and Development Comparison (Australia). Project No 93/123. 70.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J.K., Dunstan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture 151: 315-331.
- Brown, M. R., Skabo, S., Wilkinson, B. 1998. The enrichment and retention of ascorbic acid in rotifers fed microalgal diets. Aquacult. Nutr. 4: 151-156.
- Candrea, P., Dhert, P., Novelli, A., Brissi, D., 1996. Potential gains through alimentation/nutrition improvements in the hatchery. In: B. Chatain, M. Sargolia, J. Sweetman y P. Sorgeloos (Eds.), Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects, an International Workshop. Verona, Italia, October 16-18, 1996, 149-159.
- Civera, R., Ortiz, J. L., Dumas, S., Nolasco, H., Alvarez, A., Aguas, B., Peña, R., Rosales, M., Carrasco, V., García, R., Goytortúa, E. 2002. Avances en la Nutrición de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), 9: 353-354

- Coutteau, P., Sorgeloos, P. 1997. Manipulation of dietary lipids, fatty acids, and vitamins in zooplankton cultures. *Freshwater Biol.*, 38: 501-512.
- Dhert, P. 1996. Rotifers In: P. Lavens y P. Sorgeloos (Eds.), Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fish. Tech. Pap. 361: 49-78.
- Dhert ,P., Nurhudah M., Suantika, G., Sorgeloos, P. 1999. High-density production of the rotifer *Brachionus plicatilis* in a recirculation system. *Aquaculture*, 21: 201-214
- Dhert ,P., Rombaut, G., Suantika, G., Sorgeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 23: 129-146
- Duray, M. N., L. G. Aplazan y C. B. Estadillo. 1996. Improved hatchery rearing of mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* in large tanks with small rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia*. *Bamidgeh*, 48(3): 123-132.
- Eda, H., Murashige, R., Oozeki, Y., Hagiwara, A., Eastham, B., Bass, P., Tamaru, C. S., Lee, C.-S. 1990. Factors affecting intensive larval rearing of striped mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture*, 91: 281-294.
- Fielder, D. S., Purser, G. J., Battablene, S. C. 2000. Effect of rapid changes in temperature and salinity on availability of rotifers *Brachionus rotundiformis* and *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 189: 85-99.
- Fu, Y., Hada, A., Yomashita, T., Yoshida, Y., Hino, A. 1997. Development of a continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia*, 358: 141-151.
- Fukusho, K. 1989a. Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis* (1). *Int. J. Aq. Fish Technol*, 1: 232-240.
- Fukusho, K. 1989b Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis* (2). *Int. J. Aq. Fish Technol*, 1: 292-299
- Fulks, W., Main, K. L. (Eds.). 1991. Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop, Honolulu, Hawaii, January 28-31, 1991. Redmond, Argent Chemical Laboratories, 364.

- Gatesoupe, F. J. 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 96: 335-342.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W. L. Smith y M. H. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrates Animals*. New York, Menum Publishing Corporation, 29-60.
- Guzmán, R. 2004. "Cultivo Experimental del Rotífero *Brachionus Rotundiformis* Alimentados con una Dieta Comercial" Director Velasco Blanco Gabriela. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias del Mar.
- Hernández-Martínez, M. (Ed.). 2002. Reunión nacional sobre cultivo de peces marinos. Instituto Nacional de la Pesca, Ciudad de México, 167.
- Hernández Molejón, O. G. y L. Alvarez-Lajonchère (en prensa). Manual de alimento vivo para larvas de peces marinos. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 122.
- Hoff, F. H., Snell, T. W. 1989. *Plankton Culture Manual*. Dade City, Florida AquaFarms Inc., 126.
- Huguenin, J. E., Colt, J. 1989. *Design and Operating Guide for Aquaculture Seawater Systems*. Amsterdam, Elsevier, 264.
- Imada, O., Kageyama, Y., Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., Yone, Y. 1979. Development of a new yeast as a culture médium for living feeds used in the production of fish seed. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45: 955-959.
- James, C. M., Al-Hinty, S., Salman, A. E. 1989. Growth of  $\omega$ -3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture* 77: 337-351.
- James, C. M., Abu-Rezeq, T., Al-Khars, A. M. 1990. Effect of *Chlorella* cell density and culture conditions on the nutritional quality of *Brachionus* sp. *Ann. Res. Rep. Kuwait Inst. Sci. Res.* 1986: 26-29.

- Kagone, T., Hagiwara, A., Imaizumi, K. 1997. Temperature conditions enhancing resting egg production of the eurihaline rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller (Kamiura strain). *Hydrobiologia*, 358:167-171.
- Lavens, P., Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fish. Tech. Pap., 361: 1-295.
- Lee, C.-S., Tamaru, C. S. 1993. Live larval food production at the Oceanic Institute, Hawaii. In: J. P. McVey (Ed.), CRC Handbook of Mariculture, 2a ed., Vol. 1, Crustacean Aquaculture. Boca Raton, CRC Press, pp. 15-28.
- Léger, P., Grymonpre, D., Van Ballaer, E., Sorgeloos, P. 1989. Advances in the enrichment of rotifers and *Artemia* as food sources in marine larviculture. *Aquaculture Europe' 89*, Short communications and Abstracts, Eur. Aqua. Soc., Bordeaux, Special Publication, 10: 141-142.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hidrobiología*, 147: 245-255.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis sp.*) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture* 133: 295-309.
- Lubzens, E., Minkoff, G., Barr, Y., Zmora, O. 1997. Mariculture in Israel – past achievements and future directions in raising rotifers as food for marine fish larvae. *Hydrobiologia* 358: 13-20.
- Lubzens, E. y Zmora O. 2003. Production and nutritional value of rotifers (capítulo 2). In: Stottrup, J.G. y L.A. McEvoy (Eds.), *Live feeds in marine aquaculture*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 318.
- Moretti, A., Pedini Fernandez-Ciado, M., Cittolin, G., Guidastri, R. 1999. Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. Vol. 1. Rome, FAO, 194.
- Okauchi, M., Fukuso, K. 1985. Different modes in carrying resting eggs between two wild types of the rotifer *Brachionus plicatilis* from Matsusaka. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.*, 51-11: 1907.



- Peña-Martínez R y Dumas S. 1998. Desarrollo ontogenético del tubo digestivo de larvas de la cabrilla arenera, *P. maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) (Teleostei: Serranidae). IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Manuscritos de conferencias y resúmenes de carteles, Parte 2. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S. México.
- Planas, M. and Cunha, I. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177: 171-190.
- Sánchez, J. 2006. Adaptación de Técnicas de Cultivo Intensivo del Rotífero *Brachionus rotundiformis* a las Condiciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Mazatlán Sinaloa. UNAM, Facultad de Ciencias.
- Sarma, S. S. y S., 1991a. Rotifers and aquaculture (Review). *Environ. Ecol.* 9: 414-428 (India).
- Sarma, S. S. y S., 1991b. Rotifera. In Pandian TJ & Marian MP (eds). Manual on culture of live food organism. Marine Products Export Development Authority, Government of India, Cochi: 47-61 (India).
- Sarma, S. S. y S., Iyer N & Dumont HJ 1996. Competitive interactions between herbivorous rotifers: importance of food concentration and initial population density. *Hydrobiologia* 331: 1-7 (The Netherlands).
- Sarma, S. S. y S. Nandini S., 1998. Feeding ecology of predatory rotifers and fish larvae. *In: Workshop rotifer- fish larvae interactions UNAM, Campus Iztacala, Mexico: 55 p.*
- Sarma y Nandini S 2005a Interaction among copper toxicity, temperature and salinity on the population dynamics of *Brachionus rotundiformis* (Rotifera). *Hydrobiologia* 546: 559-568 (Kluwer, The Netherlands).
- Sarma y Nandini S 2005b Combined effects of food concentration and temperature of competition among four species of *Brachionus* (Rotifera). *Hydrobiologia* 546: 519-534 (Kluwer, The Netherlands).

- Schipp G., Bosmans J. & Humphrey J. 2007. Northern Territory Barramundi Farming Handbook. Northern Territory Department of Primary Industry, Fisheries and Mines, Technical Publication, 71p.
- Snell, T.W. 1991. Improving of mass systems for the rotifer, *Brachionus plicatilis*, In: Fulks, W., K.L. (Eds.), Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceeding of US Asia Workshop, Honolulu, Hawaii, Jan., 28-31, pp. 61-71.
- Stottrup, J. G. y L. A. McEvoy. 2003. Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Science Ltd., Oxford, 318 pp.
- Suantika, G., Dhert, P., Nurhudah, M., Sorgeloos, P. 2003a. High-density production of the rotifer *Branchionus plicatilis* in a recirculation system: consideration of water quality, zootechnical and nutritional aspects. *Aquacult. Eng.*, 21: 201-213.
- Suantika, G., Dhert, P., Sweetman, e., O'Brien, E., Sorgeloos, P. 2003b. Technical and economical feasibility of a rotifer recirculation system. *Aquaculture*, 227:173-189.
- Tamaru, C. S., Lee, C-S., Ako, H. 1991. Growth and survival of larval milkfish (*Chanos chanos*) and striped mullet (*Mugil cephalus*) grown on rotifers fed combination of baker's yeast and/or *Nannochloropsis oculata*. In: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier (Eds.), Larvi'91fish & Crustacean Larviculture Symposium, European Aquacult. Soc. Spec. Publ. 15: 43-44.
- Tamaru, C. S., FitzGerald, W. J., Jr., Sato, V. 1993a. Hatchery Manual For The Artificial Propagation of Striped Mullet (*Mugil cephalus* L.). Guam Aquaculture Development and Training Center and The Oceanic Institute, Guam, 167 pp.
- Tamaru, C. S., Murashihe, R., Lee, C-S., Ako, H., Sato, V. 1993b. Rotifers fed various diets of baker's yeast and/or *Nannochloropsis oculata* and their effect on the growth and survival of striped mullet (*Mugil cephalus*) and mulk fish (*Chanos chanos*) larvae. *Aquaculture* 110: 361-372.
- Toledo, A. 1988. *Energia, Ambiente y Desarrollo*.
- Tucker, J. W., Jr. 1998. *Marine Fish Culture*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 750 pp.

- Velasco, G. y Duncan, N. 2002. Cultivo masivo del rotífero *Brachionus rotundiformis* en un sistema de invernadero como alimento vivo para larvas de peces marinos (Poster) 2002. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán.
- Walz, N., Hintze, T., Rusche, R. 1997. Algae and rotifer turbidostat: studies on stability of live feed cultures. *Hydrobiologia*, 358: 127-132.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Arakawa, T., Fukusho, K., Fujita, S. 1978. Nutritional quality of rotifer *Brachionus plicatilis* as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44: 110-114.
- Watanabe, T., 1982. The production of food organisms with particular emphasis on rotifers. In: Report on Training Course on Seabass Spawning and Larval Rearing. Songkhla, Thailand, 1-20 June 1982, SCS/GEN/82/39, 26-28.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S. 1983. Nutritional value of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34: 115-143.
- Yoshimura, K., Miyamoto, Y., Nakamura, T. 1994. High density cultivation of the rotifer. *Brachionus plicatilis*, by feeding condensed *Chlorella*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 60: 207-213.
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., Hagiwara, A. 1997. Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschgunoff. *Hydrobiologia*, 358: 139-144.
- Yoshimura, K., Tanaka, K., Yoshimatsu, T. 2003. A novel culture system for the ultra-high-density production of the rotifer, *Brachionus rotundiformis*-a preliminary report. *Aquaculture*, 227: 165-172.
- Yúfera, M., Pascual, E. 1980. Estudio del rendimiento de cultivos del rotífero *Brachionus plicatilis* O. F. Muller alimentados con levadura de panificación. *Invest. Pesq.* 44: 361-368.
- Yúfera, M., Pascual, E. 1984. La producción de organismos zooplanctónicos para la alimentación larvaria en acuicultura marina. *Inf. Téc. Inst. Inv. Pesq.*, 119: 3-27.

Zambonino-Infante JI, Cahu CI, Peres A., Quazugel P, Le Gall Mm. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed Artemia rations: growth, páncreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture*, 139: 129-138.