

03096



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA ³
DE MEXICO

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA

EFFECTO DE *Chlorella vulgaris* VIVA Y MUERTA
SOBRE EL CRECIMIENTO POBLACIONAL DE
Brachionus calyciflorus PALLAS Y *Brachionus patulus*
(MÜLLER) (ROTIFERA: BRACHIONIDAE) EN
LABORATORIO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ELVIA LUCIA PAVON MEZA

286900

C.U., CIUDAD DE MEXICO,

DICIEMBRE 2000



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Zoología Acuática,
en la Unidad de Morfofisiología de la ENEP Iztacala, UNAM.
Bajo la dirección del Dr. S.S.S. Sarma,
dentro del programa de Posgrado del ICMYL
y con la beca de CONACyT 67991017.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las más sinceras gracias:

Al Dr. S.S.S. Sarma, en especial, por aceptarme en su equipo de trabajo y por brindarme de su tiempo además de los conocimientos necesarios que me han dado la oportunidad, no solo de poder hacer investigación sobre un mundo tan fascinante, sino de aprender y crecer como ser humano.

A la Dra. Nandini Sarma, quien con sus consejos me ha permitido hacer cada día mejor mi trabajo, pero sobre todo, porque al abrirme las puertas de su casa, también me ha abierto las de su amistad.

A los Dres. Alfonso Lugo y Ma. del Rosario Sánchez, porque durante los últimos dos años han tenido el tiempo y la paciencia para guiar mi trabajo, apoyándome a mejorar los resultados del experimento al señalar tanto mis errores como mis aciertos, con el único afán de animarme a cumplir satisfactoriamente con ésta meta.

A la Dra. Sonia Espina, por el tiempo dedicado a la revisión del escrito final y por sus acertados consejos para la realización mismo.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios y del trabajo de investigación.

A los profesores y personal del ICMYL por darme todo el apoyo para conocer más y así superarme un poco más cada día en mi formación profesional.

Y sobre todo a aquellas personas que han estado cerca y que con su amistad, muestras de cariño y paciencia, han sido parte fundamental para que alcanzara con éxito esta etapa de mi vida.

RESUMEN.

Con el fin de mantener la población de rotíferos durante los periodos de baja producción de algas, es necesario ofrecer dietas alternas, algunas de las cuales incluyen alga preservada. El presente trabajo se realizó con el fin de analizar el efecto de *Chlorella vulgaris* viva y muerta como alimento para el crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus patulus* en laboratorio. El diseño experimental consistió en que para cada especie de rotífero los tratamientos se realizaron por triplicado, utilizando tres densidades de alga (0.5×10^6 , 1.5×10^6 y 4.5×10^6 cel ml^{-1}) suministradas en tres formas diferentes (viva, muerta en agua caliente y congelada) por lo que se tuvo un total de 54 lotes experimentales. Los cultivos se iniciaron con 1 rot ml^{-1} , en recipientes de plástico transparente, con 50 ml de medio EPA con pH de 7.5; se mantuvieron con luz difusa en forma constante y temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Diariamente y hasta que las poblaciones disminuyeron, se realizaron conteos de la población en cada lote, tomando alícuotas de 1.0, 0.5 ó 0.2 ml según la densidad existente.

Para *B. calyciflorus* el intervalo de los valores de máxima densidad poblacional fueron de 55 ± 1 ind ml^{-1} (a 0.5×10^6 cel ml^{-1}) a 471 ± 72 ind ml^{-1} (a 4.5×10^6 cel ml^{-1}) con *C. vulgaris* viva, pero mucho más bajo (6 ± 1 a 26 ± 6 ind ml^{-1}) con alga congelada o muerta en agua caliente, bajo niveles comparables de alimentación. Sin embargo, la máxima densidad poblacional de *B. patulus* al alimentarlo con *C. vulgaris* viva o muerta en agua caliente fue similar a niveles comparables de alimentación, pero cuando se suministró alga congelada, el resultado fue cuatro veces menor. El promedio más alto de la densidad poblacional fue 1227 ± 83 ind ml^{-1} en 4.5×10^6 cel ml^{-1} . La tasa neta de crecimiento poblacional por día para *B. calyciflorus* varió de 0.50 a 0.79 al utilizar *C. vulgaris* viva, pero bajo condiciones similares, este intervalo resultó más bajo (0.21 a 0.31) para *B. patulus*.

Los resultados permitieron concluir que aunque la población de *B. calyciflorus* requiere de alga viva para crecer de manera óptima; debido a sus hábitos alimenticios, *B. patulus* puede desarrollarse adecuadamente con alga muerta en agua caliente y como las tasa de crecimiento poblacional fueron positivas en los tratamientos con alga muerta, con alga congelada se puede mantener el cultivo de estas dos especies durante cortos periodos de tiempo, cuando no se cuenta con el alga viva suficiente.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	6
<i>Bachionus calyciflorus</i>	8
<i>Brachionus patulus</i>	9
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Cultivo y cosecha de microalga:	
Cultivo de rotíferos con alga viva	14
Cultivo de rotíferos con alga congelada ...	14
Cultivo de rotíferos con alga muerta en agua caliente.....	14
Cultivo de rotíferos:	
Mantenimiento de cepas	15
Diseño experimental	15
Diagrama de flujo	17
RESULTADOS.	
Crecimiento poblacional de <i>B. calyciflorus</i>	18
Crecimiento poblacional de <i>B. patulus</i>	27
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	41
LITERATURA CITADA	42

INTRODUCCIÓN

Los rotíferos (Rotifera) constituyen una clase de pseudocelomados dentro de la línea de los asquelmintos (Nogrady *et al.*, 1993). Son los metazoos eutélicos más pequeños, compuestos alrededor de un millar de células (Pourriot, 1991) y cuyo cuerpo está cubierto con una cutícula delgada y flexible que se extiende sobre la hipodermis (Margalef, 1983). Con algunas excepciones, el cuerpo de los rotíferos se encuentra dividido en cabeza, cuello, tronco y pie mediante pliegues (Edmondson, 1959). Se han descrito aproximadamente 2000 especies (Sládeček, 1983) las cuales poseen dos características distintivas, en primer lugar la región ciliada llamada corona que constituye la cabeza en la región apical y tiene funciones de locomoción y de alimentación al mismo tiempo (Ooms-Wilms, 1998) y en segundo lugar el mástax, una "faringe" muscular cuya forma está dada por un grupo de mandíbulas que se denomina trofi; esta estructura se encuentra presente en todos los rotíferos y se utiliza para la identificación de género a especie (Pennak, 1989, Wallace y Snell, 1991).

La clasificación que establecieron Nogrady *et al.* (1993) es la siguiente:

Phylum ROTIFERA	Orden PLOIMIDA
Clase DIGONONTA	Familia ASPLANCHNIDAE
Orden SEISONIDEA	BIRGEIDAE
BDELLOIDEA	BRACHIONIDAE
Clase MONOGONONTA	CLARIIDAE
Orden COLLLOTHECACEA	COLURELLIDAE
Familia ATROCHIDAE	DICRANOPHORIDAE
COLLOTHECIDAE	EIPHANIDAE
Orden FLOSCULARIACEA	EUCHLANIDAE
Familia CONOCHILIDAE	GASTROPODIDAE
FILINIDAE	LECANIDAE
FLOSCULARIIDAE	LINDIIDAE
HEXARTHRIIDAE	MICROCODONIDAE
TESTUDINELLIDAE	MYTILINIDAE
TROCHOSPHAERIDAE	NOTOMMATIDAE
	PROALIDAE
	SYNCHAETIDAE
	TRICHOCERCIDAE
	TRICHOTRIIDAE

La parte posterior del cuerpo termina en un "pie" de formación variable, más o menos móvil, frecuentemente acabado en pinza con "dedos" y a veces con espolones preapicales, donde comúnmente se encuentran glándulas que producen una secreción

adhesiva (Margalef, 1983). Su tamaño se encuentra entre los 45 μm y 2.5mm, siendo la longitud más común de 100 a 500 μm (Sládeček 1983).

El sistema reproductor es de importancia taxonómica básica para la división sistemática del grupo en clases, ya que ésta se hace con base al número de ovarios presentes y el desarrollo de machos en la población, de tal forma que el tipo de reproducción varía según las tres clases de rotíferos (Edmondson, 1959). En las especies de la clase Seisonidea la reproducción es exclusivamente en forma bisexual (meiosis clásica y producción de dos cuerpos polares para la gametogénesis); en otro extremo, los miembros del orden Bdelloidea se reproducen exclusivamente por partenogénesis asexual y no se han observado machos; por último, las especies de la clase Monogononta presentan partenogénesis ciclica, donde la reproducción asexual predomina, pero la reproducción sexual también puede ocurrir ocasionalmente (Wallace y Snell, 1991).

Aunque la presencia de machos es rara, en la temporada en que estos se encuentran, pueden ser abundantes (Edmondson, 1959; Pennak, 1989). Estos son pequeños, tienen aproximadamente la tercera parte de la longitud de las hembras, son de vida corta. El tracto digestivo está ausente ó es vestigial por lo que el saco espermático ocupa la mayor parte del pseudoceloma. Algunas especies presentan mástax y estómago, pero la boca y el ano nunca se presentan. Su forma es muy diferente a la de las hembras pues no tienen una lórica bien desarrollada o espinas y la corona siempre es anterior y bien provista con cilios, por lo que su desplazamiento es muy rápido. En la copulación el macho inyecta el esperma, a través de la cutícula de la hembra, dentro de la cavidad del cuerpo de ésta mediante un pene, que es una proyección cónica situada atrás del pie en posición dorsal (Gilbert y Williamson, 1983).

En general, los rotíferos son ovíparos, es decir, que forman huevos en los que se desarrolla cada embrión fuera del cuerpo de la hembra. Muchas especies planctónicas cargan sus huevos adheridos al cuerpo, mientras que otros los fijan a un sustrato o los liberan en el plancton y algunas especies retienen el embrión en el cuerpo hasta la eclosión, por lo que se consideran ovovivíparas. Por otra parte, los huevos de resistencia, también llamados de invierno o fertilizados, presentan una gruesa cubierta y a menudo están ornamentados; son sumamente resistentes, a la desecación, a altas y bajas temperaturas y a condiciones químicas adversas durante largos periodos de tiempo (Pennak, 1989; Wallace y Snell, 1991).

La mayoría de los rotíferos muestran una distribución cosmopolita (Sládeček, 1983), muy pocas especies son parásitos y en general todos son herbívoros o

depredadores de vida libre (Wallace y Snell, 1991; Rao, 1996) que ocupan gran diversidad de ambientes. Los cuales han sido clasificados por Pejler (1995) como macroambientes, entre los que se mencionan

→ Lagos y reservorios "armónicos", los cuales tienen una composición estándar de constituyentes químicos y en los que se pueden encontrar la mayoría de especies de rotíferos.

→ Aguas Árticas y Antárticas, donde las pocas especies resistentes que se han encontrado no son plactónicas y tienen un número reducido de individuos, además de que las poblaciones se caracterizan por colapsarse y formar huevos de resistencia cada estación.

→ Manatales calientes, entre 40 y 45 °C, donde sólo se han encontrado *Adineta gracilis*, *Rotatoria rotatoria* y *Adineta glauca*, tres especies de bdelloideos cuya capacidad de criptobiosis les ha permitido sobrevivir en este ambiente extremo.

→ Ambientes hipertróficos, que son ambientes caracterizados por alta saprobiedad y baja concentración de oxígeno, en los que se encuentran pocas especies como *Rotatoria neptunia* y *R. saprobica*, las cuales se han designado como polisaprobias.

→ De las especies encontradas en ambiente de fango, destacan los bdelloideos con capacidad de anhidrobiosis.

→ Aguas fuertemente ácidas, con pH de 2 a 3, donde se se mencionan como dominantes comunes las especies *Brachionus urceolaris sericus*, *Lecane lauterborni*, además de *Keratella serrulata* y *K. taurocephala*.

→ Las agua salinas incluyen aguas continentales con una conductividad electrolítica alta independientemente del tipo de iones dominantes. En estos ambientes, las especies *Brachionus plicatillis*, *B. dimidiatus* y algunas del género *Synchaeta*, *Hexartra* y *Trichocerca* se describen como dominantes, aunque al parecer algunas formas de *Proales* también tienen la capacidad de tolerar salinidad elevada.

→ Los cuerpos de agua temporales, que presentan cambios rápidos de los factores ambientales, albergan una rica fauna de rotíferos, cuyo ciclo de vida está obviamente programado genéticamente para una corta estancia.

→ Algunos rotíferos se encuentran en aguas subterráneas, donde según Sládeček (1983) su presencia demuestra un efecto de filtración deficiente del suelo y posible contaminación de esta agua desde la superficie.

- ▼ Se ha visto que las especies de rotíferos que se encuentran dentro de la fauna ribereña en aguas corrientes, también se encuentran en aguas lénticas (Koste, 1978).
- ▼ El número de especies que se han encontrado en los océanos es mucho más pequeño que en las aguas dulces y sólo los géneros *Seison* y *Synchaeta* están presentes.
- ▼ Algunos rotíferos, principalmente del orden Bdelloidea (Donner, 1965) se encuentran en ambientes terrestres como suelos húmedos, musgos, líquenes y otros, que retienen pequeñas gotas de agua. Sin embargo, durante algunos periodos, esos ambientes se puede secar completamente por lo que los animales sobreviven mediante huevos de resistencia o anhidrobiosis.

Casi las tres cuartas partes de las especies de rotíferos son sésiles y están asociados a sustratos litorales. Aproximadamente 100 especies son completamente planctónicas y forman una parte significativa del zooplancton; se mencionan entre los invertebrados de cuerpo blando más importantes del zooplancton de ríos y lagos, pues cubren el nicho ecológico de los pequeños filtradores, que en el mar está ocupado principalmente por un gran número de larvas de diversos organismos (Wetzel, 1981; Margalef, 1983). Generalmente pueden alcanzar altas densidades en agua dulce, mientras que son menos numerosos en ambientes marinos o salinos, de tal forma que en aguas continentales se encuentran densidades de aproximadamente 1000 ind L⁻¹, pero si disponen de suficiente alimento, ocasionalmente pueden existir densidades mayores a 5000 ind L⁻¹ (Wallace y Snell, 1991).

Debido a su pequeño tamaño y a la permeabilidad del integumento, los rotíferos son muy susceptibles a los cambios físico-químicos del ambiente y por lo tanto son muy sensitivos a los cambios en la calidad del agua (Gannon y Stemberger, 1978) y por su rápida reproducción y veloz tasa de desarrollo (la más alta del zooplancton) pueden aportar hasta el 70% del total de la producción en ciertos cuerpos de agua (Margalef, 1983).

En los últimos años se han incrementado las investigaciones con rotíferos, no sólo en aspectos taxonómicos, sino también en áreas de investigación aplicada, tales como su influencia en la alimentación de peces y crustáceos o su relación en aspectos de contaminación (Sarma, 1988). Cabe señalar que los rotíferos son el alimento ideal para las larvas de peces y crustáceos, debido a su tamaño pequeño, crecimiento rápido y alto valor nutritivo (Pourriot, 1991; Rico-Martínez y Dodson, 1992). Con respecto a la ecotoxicología, se utilizan como organismos de prueba, por una parte debido a la sensibilidad que presentan a bajos niveles de contaminación y por otra, a la uniformidad

genética, que resulta del modo de reproducción predominantemente partenogenético. También son indicadores de eutroficación y en general de contaminación orgánica (Sarma, 1988). Su importancia se debe a que desempeñan un papel esencial en el ciclo de producción de los sistemas acuáticos, tanto por ser filtradores y estar en estrecha relación con los productores primarios (Stemberger y Gilbert, 1985; Awaiss *et al.*, 1992) como por su relación como depredadores de otras poblaciones dentro de los cuerpos de agua (Iyer y Rao, 1993). Además, muchas especies se alimentan principalmente de detritus y bacterias que, consecuentemente, les permite ser independientes de la producción fitotrófica (Ruttner-Kolisko, 1974).

Actualmente la acuicultura como ciencia multidisciplinaria tiene importantes implicaciones en la biotecnología, donde los aspectos de alimentación y producción de larvas son los mayores requerimientos para una acuicultura exitosa. El cultivo de *B. plicatilis* se ha desarrollado adecuadamente para la alimentación de especies marinas desde hace muchos años; en cambio dentro de las actividades de acuicultura en agua dulce, solo algunas especies de braquióneos empiezan a ser utilizados extensivamente como alimento, en lugar de los conocidos nauplios de *Artemia*; pues se ha visto que estos viven un máximo de seis horas al introducirlos en agua dulce y su descomposición contribuye a aumentar la carga de materia orgánica en los estanques, con la subsecuente contaminación por bacterias que además de reducir el oxígeno disuelto pueden resultar patógenas para los organismos en cultivo (Wallace y Snell, 1991). Las únicas especies de *Brachionus* que han sido cultivadas y utilizadas como alimento vivo de crías de peces, son *B. calyciflorus*, *B. patulus* y *B. rubens* (Schluter y Groeneweg, 1981, Khadka y Rao, 1986; Sarma, 1991; Pavón-Meza, 1993; Darhil, 1997)

La producción de rotíferos en condiciones de cultivo masivo consiste en mantener por separado los cultivos de rotíferos y de alga en volúmenes determinados, pero se ha comprobado que la producción intensiva de algas vivas constituye sin duda costos muy altos, por lo que actualmente las técnicas de cultivo tienden a obtener los mejores rendimientos en la producción de microalga a menores costos (Bernabé, 1991; Snell, 1991).

ATENCEDENTES

Según lo señala Ahlstrom (1940), *Brachionus* es el nombre genérico más antiguo que se ha aplicado dentro de los rotíferos y fue utilizado por Pallas; se refiere a organismos con una amplia distribución, confinados en aguas con un pH superior a 6.6 y que no se encuentran en aguas ácidas. Se distribuyen en aguas dulces tropicales y subtropicales, con excepción de *B. plicatilis* y *B. rotundiformis* que son eurihalinos (Sarma, 1991). En este género la lóricas es bastante rígida y se divide en placas dorsal y ventral, aunque en algunas especies como *B. calyciflorus* y *B. plicatilis* esta separación no se encuentra bien definida; en algunas especies existe una tercera placa (basal) más o menos desarrollada. Comúnmente la parte anterior dorsal de la lóricas forma varias espinas cuyo número, forma y longitud relativa es de gran importancia taxonómica, al igual que la forma y posición de la apertura del pie, la presencia de espinas posteriores, la posición de la antena lateral y el tipo de ornamentación de la lóricas y de los huevos de resistencia (Koste, 1978). En su medio natural, el consumo de partículas alimenticias consiste de fitoplancton, detritus y bacterias en un intervalo de 5 a 20 μm de diámetro (Sarma, 1991).

La forma de reproducción se basa en partenogénesis cíclica que consiste en una alternancia de generaciones en donde un variado número de generaciones son monogámicas y bajo ciertas condiciones externas cambia a una reproducción sexual. Este cambio en la reproducción se lleva a cabo de una generación a la siguiente; es decir, una hembra normalmente sólo se reproduce por partenogénesis diploide (amíctica) o por huevos míclicos haploides, que pueden ser fertilizados (Ruttner-Kolisko, 1974). Por otra parte, la producción de hembras míclicas y la duración de su reproducción depende de la duración del estímulo desencadenante. Las hembras míclicas producen pequeños huevos haploides por meiosis que, si no son fertilizados, se desarrollan en machos haploides, los cuales, por su tamaño pequeño no compiten por el alimento con las hembras presentes y su única función es la fertilización de las hembras míclicas que lleva a la formación de un huevo de resistencia (Wallace y Snell, 1991).

Los rotíferos se cultivan en el laboratorio con fines de investigación desde que Pennak (1953) describió algunos medios elaborados con leche que sirvieron para mantener a ciertas especies durante algún tiempo con el fin de estudiar su biología. También Pourriot (1980) menciona el desarrollo de cultivos axénicos desde 1953, cuando

diversos medios y algas se utilizaron de manera empírica como alimento. Pero el cultivo masivo del rotífero eurihalino *Brachionus plicatilis* se estableció en Japón, uno de los países más importantes en el desarrollo de la acuicultura, desde hace 40 años con la finalidad de utilizarlo como alimento de larvas de camarón y peces; para lo cual los rotíferos eran transferidos de un estanque a otro de *Chlorella* (Hirata, 1980; Torrentera-Blanco, 1983; García, 1988).

El cultivo de *B. plicatilis* ha permitido realizar una gran cantidad de estudios utilizando esta especie como modelo experimental en la biología de los rotíferos (Rico-Martínez y Snell, 1997), entre los que destacan algunos estudios sobre fisiología, tales como la cuantificación de la filtración del alimento y el tamaño de las partículas ingeridas (Hino e Hirano, 1980), el efecto de la temperatura en el cultivo (Hirayama y Kusano, 1972; Neumann-Leitão *et al.*, 1989), requerimientos ambientales para la formación y cultivo de huevos de resistencia (Hino e Hirano, 1976, 1977) y el contenido de DNA, RNA y proteínas (Heggemann, *et al.*, 1998), los cuales han servido como base para el conocimiento sobre su biología y han permitido el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo, extendiendo los estudios para el cultivo de rotíferos dulceacuícolas.

Las especies dulceacuícolas *B. angularis*, *B. calyciflorus*, *B. patulus* y *B. rubens* se han logrado aislar y mantener con fines de cultivo (Schlüter, 1980; Ríos-Becerril y Ramírez-Granados, 1987; Bennet y Boraas, 1988; Rico-Martínez y Dodson, 1992; Pavón-Meza, 1993) y se ha explorado el uso de organismos del género *Emcentrum* y *Ascomorpha* (Sarma, 1991). En los trabajos sobre el cultivo de *B. calyciflorus* se ha encontrado que con una dieta adecuada, se pueden obtener valores nutricionales cercanos a los que se han encontrado en *B. plicatilis* (Rico-Martínez y Dodson, 1992), por lo que este organismo se ha utilizado de manera favorable para alimentar crías de peces y crustáceos de agua dulce (Awais, *et al.*, 1992; Dahri, 1997).

Es importante señalar que los estudios sobre la dinámica poblacional de rotíferos permiten analizar bajo condiciones experimentales, el efecto de componentes ambientales tales como alimento, temperatura, depredación, competencia y pH, entre otros, sobre el aprovechamiento de los recursos o el efecto de condiciones adversas para el desarrollo de la población (King y Miracle, 1980). Con base en estos análisis, se señala que el crecimiento poblacional de *Brachionus patulus* se altera cuando se suministran bajas concentraciones de alimento en combinación con temperaturas adversas y que el comportamiento de una población en su medio natural es semejante a los organismos en cultivo (Sarma, 1985; Sarma y Rao, 1990, 1991). Por otra parte, Guisande y Mazuelos

(1991) mencionan que los patrones reproductivos son diferentes en las distintas especies de rotíferos; la especie *B. calyciflorus* maximiza su patrón reproductivo a altas concentraciones de alimento, al disminuir la cantidad de carbohidratos contenida en los huevos y el volumen de los mismos; en cambio se ha encontrado que *B. patulus* aumenta el tamaño de los individuos y de los huevos a altas concentraciones de alimento (Sarma y Rao, 1987).

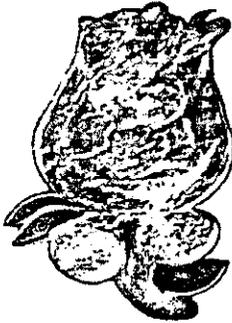


Fig. 1 *Brachionus calyciflorus*

Brachionus calyciflorus, fue descrito en 1766 (Ahlstrom, 1940) y se caracteriza por habitar aguas alcalinas; se ha localizado en sistemas acuáticos de diversos países y es fácil de cultivar debido a que presenta ciclo de vida corto y gran potencial reproductivo (Leimeroth, 1980); también se ha empleado favorablemente para mejorar la calidad del agua utilizándolo como un agente para eliminar *E. coli* en cuerpos de agua contaminados (Seaman, *et al.*, 1986); recientemente ha sido incluido como organismo estándar de bioensayo por la American Society Testing and Materials en los E.U.A. (Arévalo-Stevenson *et al.*, 1998).

Dentro de los primeros estudios sobre rotíferos que se realizaron en México, se señala la localización de *B. calyciflorus* en los cuerpos de agua de Xochimilco, Córdoba y el Lago de Chapultepec (Osorio-Tafall, 1942); posteriormente se caracteriza como un organismo mesosaprobio y habitante común en el Lago de Chapultepec (Vilaclara y Sládeček, 1989). Recientemente se ha registrado en cuerpos de agua como la Presa Antonio Alzate en Toluca, en Laguna escondida al sureste de Veracruz y Lagunas de Zempoala (Flores-Burgos, 1997; Sarma, 1999). Un aspecto interesante en esta especie es el polimorfismo que presenta (Ahlstrom, 1940), pues se ha definido que el aumento de tamaño en las espinas posterolaterales es un mecanismo de defensa asociado con la presencia del rotífero depredador *Asplanchna* (Gilbert, 1980) y aunque se puede inducir el alargamiento de estas espinas como una respuesta a las condiciones adversas del medio, por el efecto de bajas temperaturas o por bajas concentraciones de alimento; la longitud que llegan a presentar en los estudios de laboratorio siempre es menor a la que se

presenta cuando existe *Asplanchna* en el medio (Bogdan y Gilbert, 1982; Stemberger, 1990).

Gilbert (1980) refiere que el primer cultivo monoaxénico de *B. calyciflorus* se logró en un medio inorgánico al alimentar la población con *Euglena gracilis*. Dentro de las especies de microalgas que se han utilizado como alimento en los trabajos de laboratorio realizados hasta hoy, cabe destacar que *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus espinosus* han proporcionado resultados favorables en el crecimiento poblacional de éste rotífero (Sarma, 1985; Sarma y Rao, 1990; Awaís *et al.*, 1991; Rico-Martínez y Dodson, 1991; Pavón-Meza, 1993; Rothhaupt, 1995; Sarma *et al.*, 1997) lo cual resulta interesante debido a que son dos especies que habitan en el Lago de Chapultepec (Vega-Quintero, 1996; Flores-Merchant, 1999), lugar donde se ha aislado *B. calyciflorus* para ser cultivado en laboratorio (Pavón-Meza, 1993; Arévalo-Stevenson *et al.*, 1998). Otros estudios se han hecho también para analizar la ingestión de partículas en este brachiórido y se ha encontrado que el rango favorable para su alimentación es entre 5 y 12 micras (Rothhaupt, 1990).

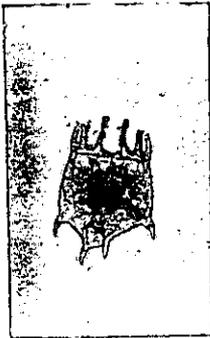


Fig. 2. *Brachionus patulus*

En 1965, Wulfert cambió la especie *Brachionus patulus* del género *Platyias* a *Brachionus* (citado por Ruttner-Kolisko, 1974). Después del análisis electrónico del trofi en muchos géneros de la familia Brachionidae, Seger *et al.* (1993) cambiaron nuevamente esta especie al género *Platyionus*. Posteriormente, con base a la forma de copulación entre organismos de los géneros *Brachionus* y *Platyias*, Rico-Martínez (1997) regresó la especie al género *Brachionus*. Los análisis moleculares recientes también apoyan este punto de vista (García-Varela *et al.*, 2000).

Brachionus patulus se distribuye en cuerpos de agua dulce con pH mayor a 6.6 y en Norte América se ha encontrado en más hábitats que cualquier otra especie de *Brachionus* (Ahistrom, 1940); por otro lado, Osorio-Tafall (1942) menciona que se encuentra muy difundido en el territorio mexicano, pero siempre en escaso número en cada localidad; actualmente se ha registrado su presencia en algunos cuerpos de agua, tanto en la región central como en el Sureste (Flores Burgos, 1997; Sarma y Elías-Gutiérrez, 1998; Sarma y Elías Gutiérrez, 1999). Es una especie fácil de reconocer ya que

presenta una lórica firme en forma casi rectangular y comprimida dorsoventralmente; en el margen anterior forma 10 espinas, de las cuales, las occipitales medianas son más largas y están encorvadas ventralmente. En la parte posterior, la lórica se estrecha y termina en dos espinas cortas; la apertura del pie tiene una forma y posición asimétrica, se localiza en la placa ventral y está limitada por dos espinas cortas, aproximadamente de la misma longitud o relativamente más cortas que las posterolaterales. La cutícula exhibe una disposición particular de crestas que dan la apariencia de placas provistas de abundantes rugosidades (Ahlstrom, 1940; Osorio-Tafall, 1942). En el trabajo sobre los rotíferos como indicadores de la calidad del agua, Sládeček (1983) lo clasifica como un organismo beta-mesosaprobio no sobresaliente. Normalmente se encuentra asociado a la vegetación por lo que se le considera pseudoplanctónico o ticoplanctónico (Ruttner-Kolisko, 1974).

Varios autores refieren el cultivo de *B. patulus* y su uso como alimento vivo en acuicultura (Khadka y Rao, 1986; Mookerji y Rao, 1993) y en la compilación que realizaron Wallace y Snell (1991) sobre las especies de rotíferos duiceacuícolas que se han cultivado con éxito, se menciona que el cultivo de esta especie se ha llevado a cabo mediante la técnica de cultivo semicontinuo. Como resultado de su trabajo, Sarma (1991) encontró que al alimentar a este rotífero sólo con *Chlorella*, se pueden alcanzar densidades de hasta 500 ind ml⁻¹. Otros trabajos basados en el cultivo en laboratorio también han permitido conocer diversos aspectos sobre sus formas de reproducción y la relación que ésta guarda con la alimentación (Rao y Sarma, 1985; Sarma y Rao, 1987), además de las características de crecimiento que se presentan asociadas a la relación entre alimentación y a la temperatura (Sarma, 1989; Sarma y Rao, 1991).

Dentro de los problemas que se han mencionado a nivel mundial dentro del cultivo industrial de rotíferos, se encuentra en primer lugar el costo que representa mantener una eficiente producción de microalgas, debido a que el éxito de los cultivos masivos depende de la presencia de óptimas condiciones ambientales y se disminuye la producción cuando las temperaturas son muy bajas o muy altas (Hur, 1991; Snell, 1991). Es por ello que desde los años sesentas, cuando se estableció en el cultivo de *B. plicatilis*, se iniciaron una serie de investigaciones con el fin de encontrar un método adecuado que permitiera la producción continua de rotíferos sin depender de los cultivos masivos de *Chlorella* (Rodríguez *et al.*, 1997). Al respecto, se introdujo el uso de levadura de pan como alimento, pero después de varios experimentos se encontró que en las crías de peces alimentadas con rotíferos producidos a partir del empleo de levadura o mezcla de

levadura y *Chlorella* como alimento, ocurrían altas mortalidades debido al desbalance nutricional causado por la falta de ácidos grasos esenciales en los rotíferos (Torrentera-Blanco, 1983); posteriormente se estableció que al utilizar *Chlorella* como alimento de *B. plicatilis*, se puede incrementar hasta el 6.1% del contenido de ácidos grasos respecto a los valores obtenidos al alimentar la población únicamente con levadura (Whyte y Nagata, 1990). Por lo tanto, se definió que mientras mayor es la acumulación de ácidos grasos y componentes de esteroles en los rotíferos, mayor es la cantidad que estos aportan al utilizarse como alimento de crías de peces (Teshima *et al.*, 1981; Lubzens *et al.*, 1985; Rodríguez *et al.*, 1997).

Recientemente se ha encontrado que el uso de alga deshidratada a la sombra ha dado buenos resultados en el cultivo de *B. plicatilis* (Dobberfuhl y Elser, 1999) al igual que *Nannochloropsis oculata* seca por congelamiento, la cual se puede utilizar con éxito para el cultivo masivo de *B. plicatilis* y *B. rotundiformis* rotífero (Navarro y Yúfera, 1998; Navarro, 1999). Sin embargo estos procesos son costosos y repercuten en la inversión de los productores y debido a que se trata de una especie marina, los resultados obtenidos no se pueden extrapolar a especies de agua dulce.

Considerando la importancia que han adquirido los rotíferos de aguas continentales como organismos de bioensayo y como alimento vivo para crías de peces, se ha buscado el uso de alimentos alternativos para el cultivo de las especies *B. calyciflorus* y *B. patulus* (Arévalo-Stevenson *et al.*, 1998; Larios-Jurado, 1999), pero es debido a que el uso de microalgas sigue siendo lo más adecuado para obtener altas densidades con buena calidad nutricia, que actualmente se buscan técnicas que permitan preservar el alga suficiente cuando se tienen altas producciones y poder utilizarla como alimento posteriormente, cuando las condiciones de su cultivo no sean las óptimas.

El propósito del presente trabajo fue buscar alternativas para la alimentación de rotíferos dulceacuícolas en cultivo cuando no se cuenta con suficiente producción de microalgas. Así como analizar el efecto que produce sobre el crecimiento poblacional, el empleo de *C. vulgaris* muerta como alimento de *Brachionus calyciflorus* y *B. patulus* cultivados en condiciones de laboratorio. Para lo cual se consideró que si el alga muerta aportaba el alimento suficiente para el adecuado crecimiento poblacional de los rotíferos, a mayor concentración de alimento se presentaría mayor crecimiento poblacional en ambas especies.

Debido a que los rotíferos son organismos filtradores con gran sensibilidad a la concentración y forma de alimento, fue de suponer también, que el alimento apropiado

para cada especie en cultivo sería diferente; por lo que este trabajo se diseñó con el siguiente objetivo:

Comparar el efecto de diferentes concentraciones de *Chlorella vulgaris* viva y muerta, sobre el crecimiento poblacional de los rotíferos *Brachionus calyciflorus* Pallas y *Brachionus patulus* (Müller) bajo condiciones de laboratorio.

Objetivos específicos:

Determinar el efecto de diferentes concentraciones de alimento en el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* y *B. patulus* y comparar el efecto del alga viva y muerta sobre el crecimiento poblacional de cada especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizaron las cepas de *Brachionus calyciflorus* Pallas y *Brachionus patulus* (Müller), las cuales fueron aisladas del Lago Mayor de Chapultepec (D.F.) y de La Presa Santa Elena (Estado de México) respectivamente y se mantienen desde hace cinco años en el laboratorio.

Debido a que los rotíferos son organismos filtradores, la cantidad de alimento que ingieren depende de su concentración en el medio; por lo que en este trabajo se utilizaron las concentraciones de alga 0.5 , 1.5 y 4.5×10^6 cels ml^{-1} , mismas que se definieron con base a la información disponible en la literatura, donde se refiere una concentración máxima de 40×10^6 cel ml^{-1} como alimento de *B. calyciflorus* (Sarma *et al.*, 1996 ; 1998).

Por otra parte, se conoce que la calidad nutricional de los rotíferos depende de la calidad del alimento que consumen (Lubzens *et al.*, 1985; Reyes-Bustamente, 1999); así, se probó el efecto de tres formas de alimento sobre el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* y *B. patulus*, utilizando *Chlorella vulgaris* viva, muerta en agua caliente y congelada.

Cultivo y cosecha de la microalga

La cepa de *Chlorella vulgaris* fue aislada del aire (Vega-Quintero, 1996) y tiene registro CL-V-3 en el CICESE, Ensenada. Para su cultivo se utilizó el Medio Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988) con pH de 7.5 y enriquecido con bicarbonato de sodio (Sarma, 1996). Los cultivos se realizaron en botellas plásticas de 2 L y se mantuvieron a 25 ± 1 °C, con aireación constante y luz difusa en forma continua.

Los cultivos se iniciaron a concentraciones entre 0.5 y 1.0×10^6 cels ml^{-1} y con el fin de garantizar la presencia de una gran cantidad de células con la calidad nutritiva adecuada (Larios-Jurado, 1999), los cultivos se dejaron crecer hasta la fase exponencial (aproximadamente 25×10^6 cels ml^{-1}) que se alcanzó entre los 7 y 10 días. Cuando se tuvo la concentración adecuada, se retiró la aireación de las botellas y se mantuvo en refrigeración durante cuatro días para permitir la sedimentación de las células. Se desechó el medio sobrenadante con el fin de eliminar las toxinas y otros microorganismos

que pudieran ser dañinos para los rotíferos, ya que en un estudio preliminar se encontró que mediante este procedimiento se obtiene una respuesta similar al de centrifugar y resuspender las células, pues éstas también se distribuyen de manera homogénea al agregarse al medio de cultivo de los rotíferos. Una vez efectuada la cosecha, el alga concentrada se puede mantener en buenas condiciones dentro del refrigerador (3 ± 1 °C) hasta por 14 días; aunque cabe indicar que en el presente trabajo se utilizó antes de la primera semana con el fin de evitar posibles alteraciones de los resultados debido al envejecimiento de las células.

Respecto a las diferentes concentraciones de alga utilizadas, éstas se prepararon por dilución del alga concentrada, con la cantidad correspondiente de medio EPA (US Environmental Protection Agency) (Anónimo, 1985), después de haber determinado la densidad de cel ml^{-1} con el hematocitómetro y bajo un microscopio óptico (Castellanos-Páez *et al.*, 1999).

Cultivo de rotíferos con alga viva

Se determinó la concentración del cultivo de alga y se realizaron las diluciones necesarias para obtener las diferentes concentraciones experimentales de 0.5, 1.5 y 4.5×10^6 cels ml^{-1} , respectivamente.

Cultivo de rotíferos con alga congelada.

Se determinó la concentración del alga viva y la cantidad necesaria para los diferentes tratamientos se congeló a -10 °C. Después de 24 h, se descongeló ésta para hacer las diluciones correspondientes, cuidando de homogeneizar el medio al momento de verterlo a los recipientes de cultivo ya que una vez muerta, el alga tiende a sedimentar.

Cultivo de rotíferos con alga muerta en agua caliente.

Se determinó la concentración del alga viva y de ahí se vertió la cantidad requerida para los tratamientos en un recipiente con medio EPA a punto de ebullición, a una

concentración de 1:10 y se esperó durante 5 min para garantizar la muerte del alga. Posteriormente, se prepararon las diluciones correspondientes con medio EPA a temperatura ambiente.

Cultivo de rotíferos

Mantenimiento de las cepas

Las especies se mantuvieron por separado, en acuarios de vidrio de 5 L que contenían aproximadamente 3 L de medio EPA y una concentración de *Chlorella* de 1.5×10^6 cels ml^{-1} , temperatura constante de 22 ± 1 °C (calentador automático de 20 watts), luz difusa continua; se mantuvo el oxígeno entre 7.5 y 8.0 mg L^{-1} y el pH entre 7.5 y 8.0. Tres veces a la semana se realizaron recambios totales del medio, desechando el sedimento que contenía lóricas, individuos muertos, organismos descomponedores y materia orgánica ya que podrían ser fuente de contaminación. Los rotíferos se filtraron por una malla de 50 μm ; se hizo un enjuague con medio EPA e inmediatamente fueron depositados en medio nuevo con el fin de causar el menor daño posible en los individuos, acorde a la técnica descrita por Sarma (1991) para el cuidado y mantenimiento de rotíferos.

Diseño experimental

Tanto para el cultivo de *B. calyciflorus* como de *B. patulus*, los tratamientos se llevaron a cabo en recipientes de plástico transparente de 200 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio EPA a pH de 7.5. Los recipientes se mantuvieron con luz difusa en forma continua y temperatura de 22 ± 1 °C, para lo cual se sumergieron en forma aleatoria dentro de un acuario con calentador automático de 20 watts. Para la siembra inicial (1 rot ml^{-1}) se utilizaron individuos de diferentes edades, provenientes de una población en crecimiento exponencial. Debido a las características de los tratamientos, después de los conteos realizados, fue necesario eliminar diariamente el alga no ingerida y cambiar el medio de cultivo de los rotíferos con el fin de renovar y

mantener constante, durante todo el experimento, la concentración del alimento suministrado en cada caso. Para ello se utilizó una malla de 50 μm , con la cual se filtraron los rotíferos y se depositaron en el medio limpio, previamente preparado con la concentración y el tipo de alga correspondiente. Para cada especie de rotífero los tratamientos se realizaron con tres repeticiones X tres formas de alimento X tres concentraciones del alga (54 lotes experimentales en total).

Los conteos de las poblaciones se hicieron bajo el microscopio estereoscópico y con ayuda de una cámara para zooplancton (Yamasaki e Hirata, 1980; Sarma, 1996). Se contaron sólo los individuos vivos, tanto juveniles como adultos, sin considerar el número de machos que se encontraron de manera ocasional, ya que éstos no contribuyen al crecimiento poblacional (Pennak, 1989).

Durante los 2 ó 3 primeros días del cultivo, se realizó el conteo total de la población y posteriormente se contó el número de rotíferos presente en 2 alícuotas de 1.0, 0.5 ó 0.2 ml, según la densidad en la población; en todos los casos, los individuos colectados se regresaron a su población original. Los conteos se continuaron hasta que la población empezó a disminuir en la mayoría de las repeticiones, por lo que los cultivos se mantuvieron durante 14 días para *Brachionus calyciflorus* y 40 días para *Brachionus patulus*.

Para determinar el crecimiento poblacional se utilizaron los siguientes modelos:

Curvas de crecimiento poblacional correspondientes al modelo logístico.

Tasa neta de crecimiento poblacional por día (r) (Krebs, 1985).

$$r = (\ln N_x - \ln N_0) / t$$

donde N_x es la población final, N_0 es la población inicial y t es el tiempo en días.

Así mismo, en cada tratamiento se determinó la abundancia máxima y el día en el cual se obtuvo ésta.

Al final de los tratamientos, se elaboraron las curvas correspondientes al crecimiento poblacional de los rotíferos, lo que permitió analizar claramente el efecto de las diferentes concentraciones de *C. vulgaris* en forma viva y muerta sobre cada una de las especies de rotífero utilizadas. Con el fin de cuantificar las diferencias entre los tratamientos, se utilizó el análisis de varianza por dos factores. Las diferencias se consideraron significativas con $\alpha=0.05$ (Sokal y Rohlf, 1985). Se empleó el programa de cómputo SIGMA STAT (1997).

En la Fig. 3 se presenta el diagrama de flujo que esquematiza los pasos que se siguieron para realizar los diferentes tratamientos del experimento.

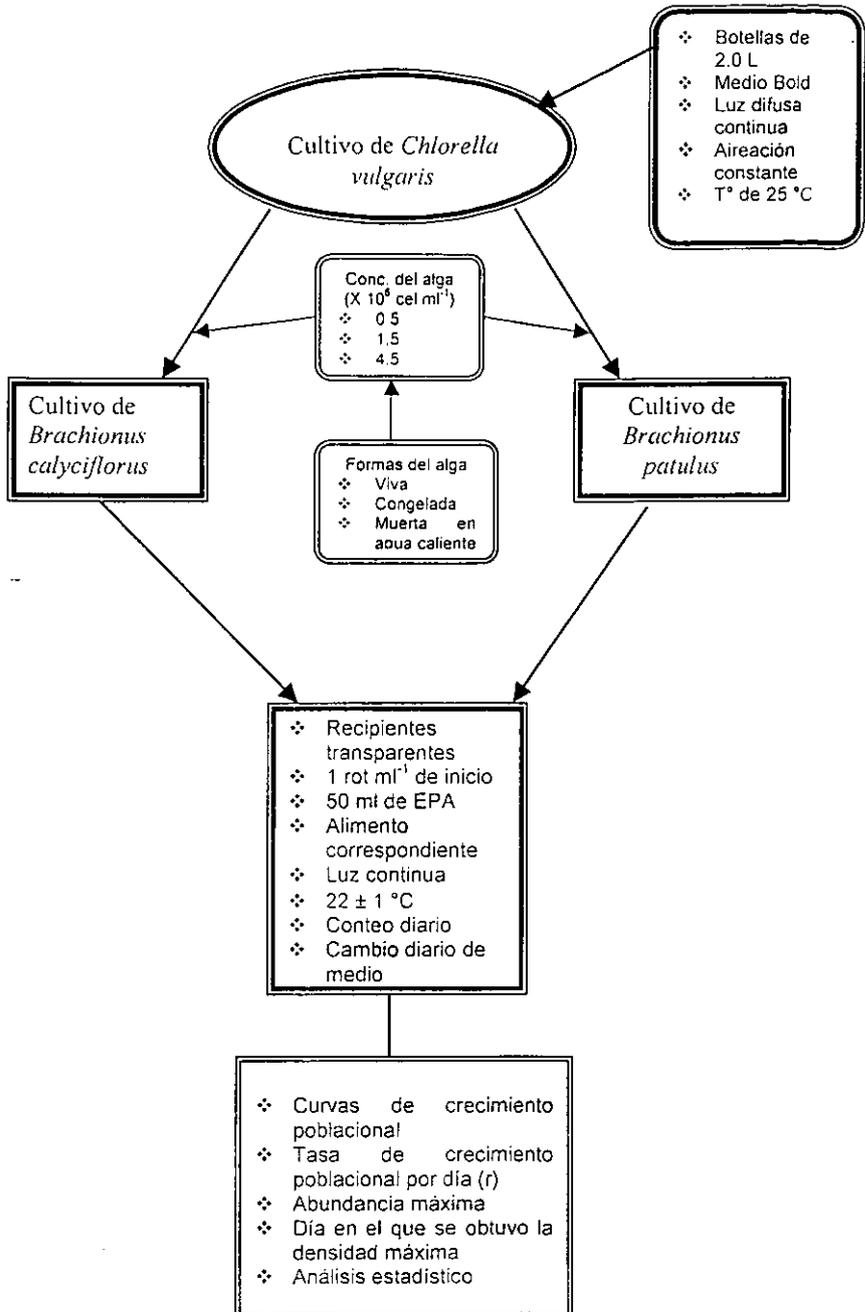


Fig. 3. Diagrama de flujo de las actividades realizadas en el transcurso del experimento.

RESULTADOS

▼ Crecimiento Poblacional de *Brachionus calyciflorus*.

Las curvas de crecimiento poblacional muestran que independientemente del tipo de alga suministrada, la densidad de rotíferos aumentó en relación de la densidad de alimento, tanto en el cultivo con alga viva (Fig. 4), como al utilizar el alga muerta en agua caliente (Fig. 5) y congelada (Fig. 6)

Las densidades máximas de la población para cada forma de *Chlorella vulgaris* se presentan en la Fig. 7. Se observa que la máxima densidad de rotíferos, 471 ± 72 ind ml^{-1} , se alcanzó con la concentración de 4.5×10^6 cels ml^{-1} de *C. vulgaris* viva; mientras que para la misma concentración de alga congelada, la máxima densidad poblacional fue de 26 ± 6 ind ml^{-1} y para el alga muerta en agua caliente fue de 36 ± 6 ind ml^{-1} , encontrando que existen diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) tanto entre las variables, como en su interacción (Tabla 1).

Las tasas de crecimiento poblacional por día varían entre 0.5 y 0.79 día^{-1} para alga viva, de 0.11 a 0.30 día^{-1} para alga congelada y de 0.10 a 0.41 día^{-1} para alga muerta en agua caliente (Fig. 8). Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre las variables, pero no así entre su interacción (Tabla 2).

Respecto al día en que se alcanza la máxima densidad poblacional, se observa que entre las formas de suministro de alga las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) y altamente significativas ($p < 0.001$) entre las tres densidades de alimento utilizado (Tabla 3), variando de 7 a 9 días para alga viva, de 5 a 10 en alga congelada y de 9 a 11 en alga muerta en agua caliente (Fig. 9).

Por lo tanto se encontró que, independientemente de la concentración de alimento empleada, el óptimo crecimiento de *Brachionus calyciflorus* se alcanza únicamente al suministrar *C. vulgaris* viva. Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos entre los tratamientos con alga muerta, se observó que al utilizar *C. vulgaris* muerta en agua caliente se obtiene mayor crecimiento poblacional del rotífero que cuando ésta se utiliza congelada.

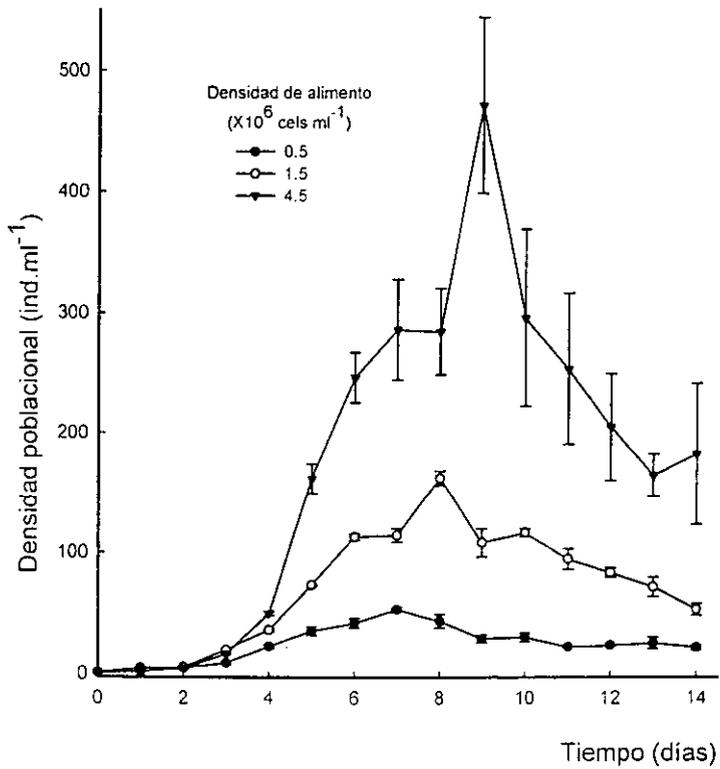


Fig. 4. Crecimiento poblacional de *B. calyciflorus*, alimentado con diferentes concentraciones de *C. vulgaris* viva. Los valores indican el promedio \pm error estándar de tres repeticiones.

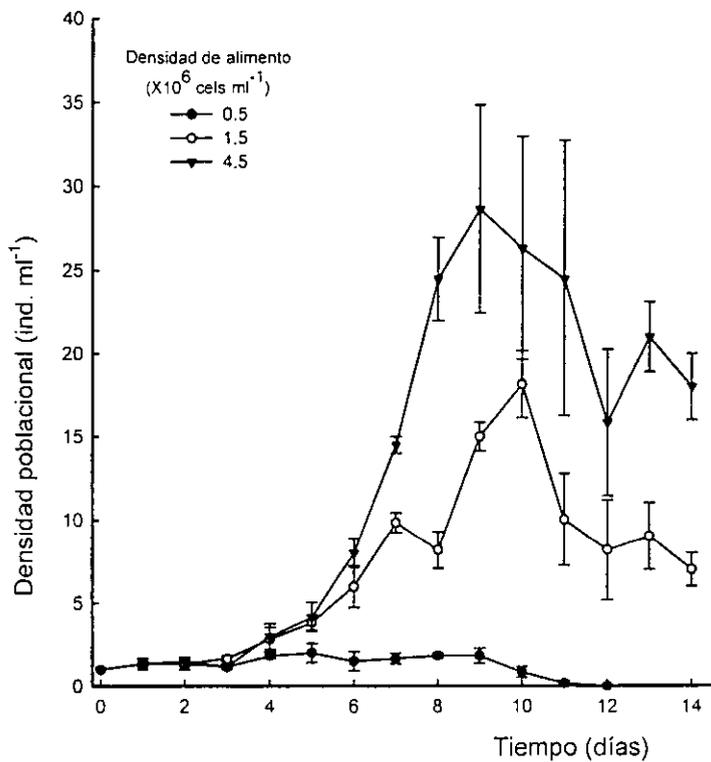


Fig. 5. Crecimiento poblacional de *B. calyciflorus*, alimentado con diferentes concentraciones de *C. vulgaris* muerta en agua caliente. Los valores indican el promedio \pm error estándar de tres repeticiones.

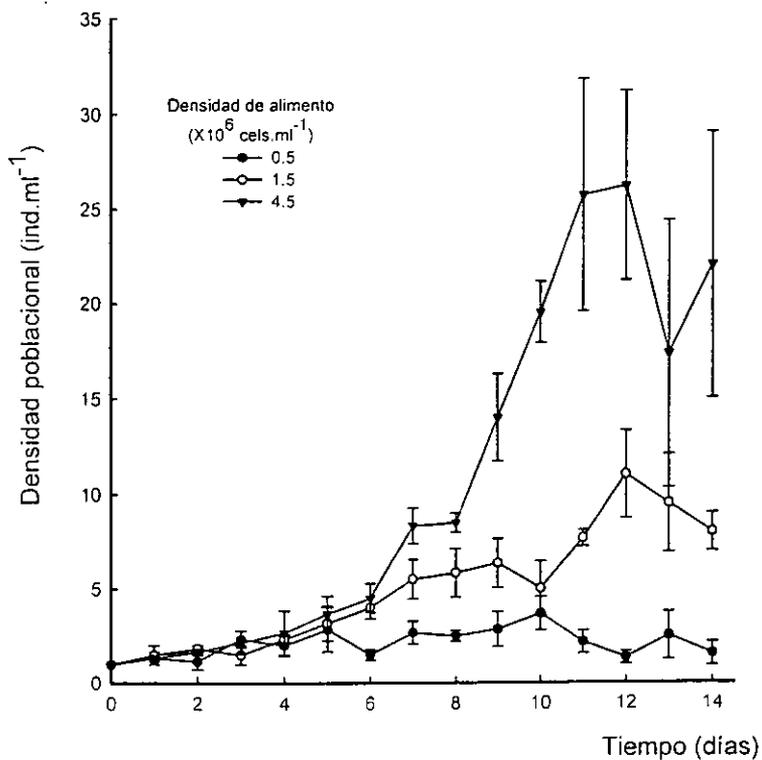


Fig. 6. Crecimiento poblacional de *B. calyciflorus*, alimentado con diferentes concentraciones de *C. vulgaris* congelada. Los valores indican el promedio \pm error estándar de tres repeticiones.

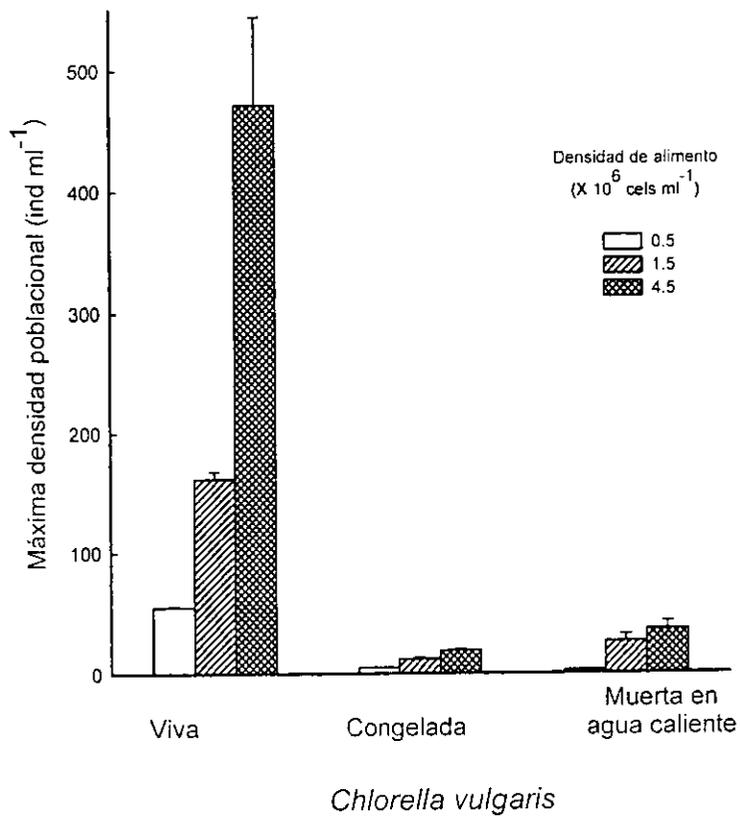


Fig. 7. Máxima densidad poblacional alcanzada por *B. calyciflorus* en relación con diferentes concentraciones de *C. vulgaris* (viva y muerta). Los valores representan el promedio ± error estándar de tres repeticiones.

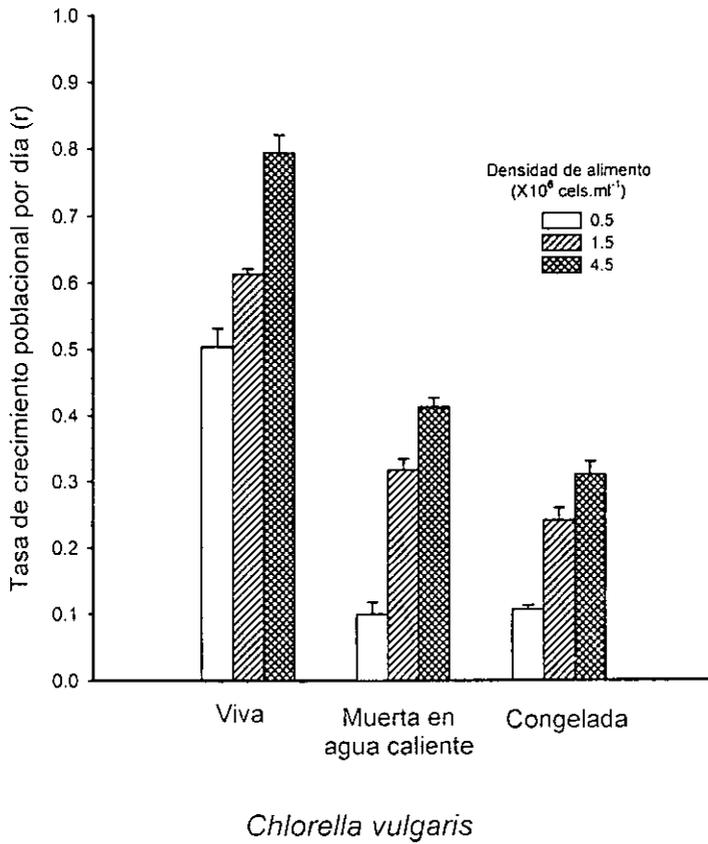


Fig. 8. Tasa de crecimiento poblacional por día de *B. calyciflorus* en relación con diferentes concentraciones de *C. vulgaris* (viva y muerta). Los valores representan el promedio \pm error estándar basado en tres repeticiones.

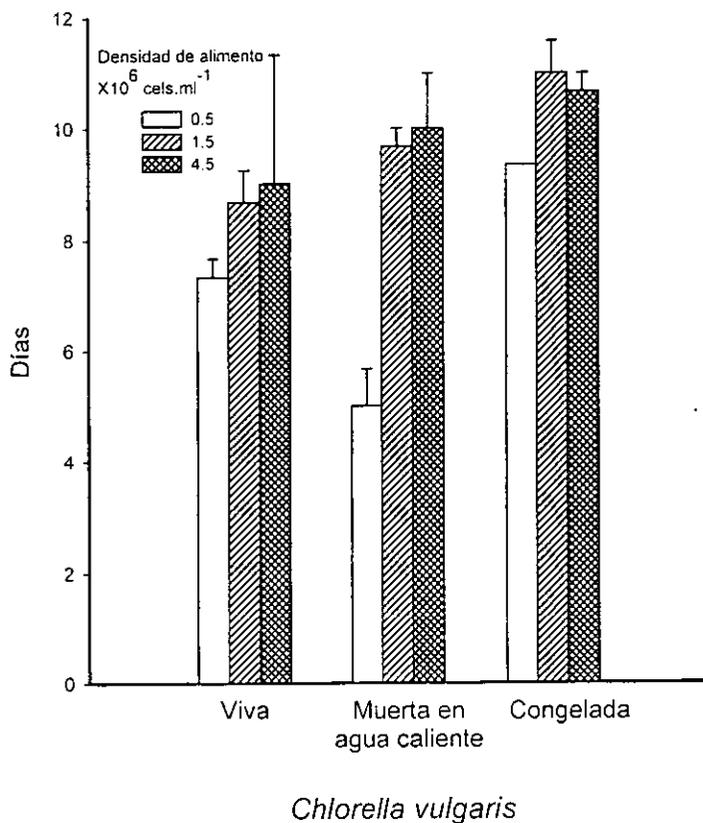


Fig. 9.

Día de máximo crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* en relación con diferentes concentraciones de *C. vulgaris* (viva y muerta). Los valores representan el promedio \pm error estándar de tres repeticiones.

Tabla 1. Análisis de Varianza por dos factores del máximo poblacional de *Brachionus calyciflorus* (ind ml⁻¹) con relación a las diferentes formas (viva y muerta) y densidades (cel ml⁻¹) de *C. vulgaris* como alimento (***) = p < 0.001).

Fuente de Variación	GL	SC	SM	F
Forma del alga (A)	2	271055.031	135527.52	75.56***
Densidad del alga (B)	2	118384.063	59192.03	33.00***
Interacción (A X B)	4	164411.719	41102.93	20.37***
Error	18	32286.688	1793.70	-

Tabla 2. Análisis de Varianza por dos factores de la tasa de crecimiento poblacional por día (r) del cultivo de *B. calyciflorus*, con relación a las diferentes formas y densidades de *C. vulgaris* (***=p < 0.001 y ns= no significativo).

Fuente de Variación	GL	SC	SM	F
Forma del alga (A)	2	0.965	0.48	282.64***
Densidad del alga (B)	2	0.305	0.15	89.26***
Interacción (A X B)	4	0.022	0.01	2.92 ns
Error	18	0.031	0.00	-

Tabla 3. Análisis de Varianza por dos factores, del día de máxima población de *B. calyciflorus*, con relación al efecto de diferentes formas y concentraciones de *C. vulgaris* (**= $p < 0.001$; **= $p < 0.05$ y ns= no significativo).

Fuente de Variación	GL	SC	SM	F
Forma del alga (A)	2	28.222	14.11	5.69**
Densidad del alga (B)	2	38.000	19.00	7.66***
Interacción (AXB)	4	17.778	4.44	1.59 ns
Error	18	44.667	2.48	-

▼ Crecimiento Poblacional de *Brachionus patulus*.

En las curvas de crecimiento poblacional donde se utilizó como alimento *C. vulgaris* viva (Fig. 10) y muerta en agua caliente (Fig. 11), se observa que en ambos casos la población de *B. patulus* aumentó en relación a la densidad de alimento; en cambio, al suministrar alga congelada (Fig. 12) se encontró que, independientemente de la concentración de alimento suministrado, el crecimiento poblacional de los rotíferos se limita a aproximadamente una cuarta parte del que se obtiene al utilizar alga viva como alimento. La máxima población de 295 ± 26 ind ml⁻¹ se alcanzó con la concentración de 1.5×10^6 cels ml⁻¹; mientras que en la concentración de 4.5×10^6 cels ml⁻¹ se limitó el crecimiento a 145 ± 26 ind ml⁻¹, valor semejante al obtenido en la concentración de 0.5×10^6 cels ml⁻¹.

Al observar los valores de máxima densidad poblacional del rotífero (Fig. 13), se encuentra que la máxima densidad de 1226 ± 82 ind ml⁻¹ corresponde a la concentración de *C. vulgaris* muerta en agua caliente; pero, a pesar de que los valores obtenidos entre este tratamiento y el de alga viva parecen semejantes, las diferencias que se presentan son significativas, tanto en las variables como en su interacción ($p < 0.001$, Tabla 4).

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variables ($p < 0.001$) y su interacción ($p < 0.05$, Tabla 5) respecto a los valores de la tasa de crecimiento poblacional por día (r), los cuales varían entre 0.21 y 0.31 día⁻¹ para alga viva, de 0.10 a 0.15 día⁻¹ para alga congelada y de 0.22 a 0.29 día⁻¹ para alga muerta en agua caliente (Fig. 14), siendo los valores del tratamiento con *C. vulgaris* congelada, los más bajos.

Respecto al día en que se alcanza la máxima densidad poblacional (Fig. 15), se observa que sólo el tratamiento con alga viva muestra una relación directa respecto a la concentración del alimento. Ya que en el tratamiento con alga muerta en agua caliente la población de *B. patulus* tardó más días para la máxima densidad (39 días para la concentración de alimento de 4.5×10^6 cels ml⁻¹) que al suministrar alga viva como alimento (37 días para la misma concentración de alimento), las diferencias que se presentaron fueron significativas, tanto entre la forma del alga ($p < 0.001$) como entre la densidad del alga y la interacción de las variables ($p < 0.05$, Tabla 6).

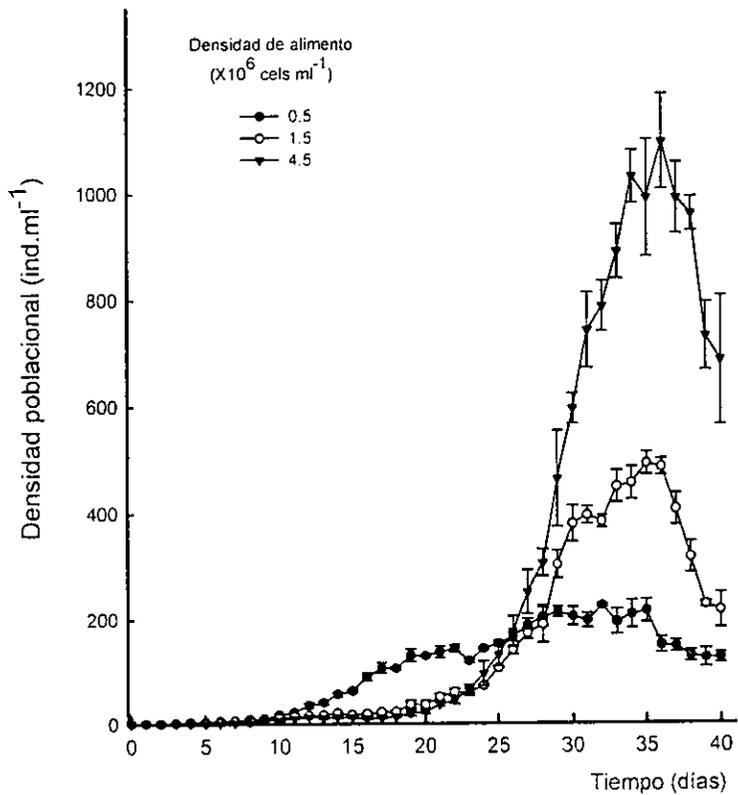


Fig. 10. Crecimiento poblacional de *B. patulus*, alimentado con diferentes concentraciones de *C. vulgaris* viva. Los valores indican el promedio \pm error estándar de tres repeticiones.

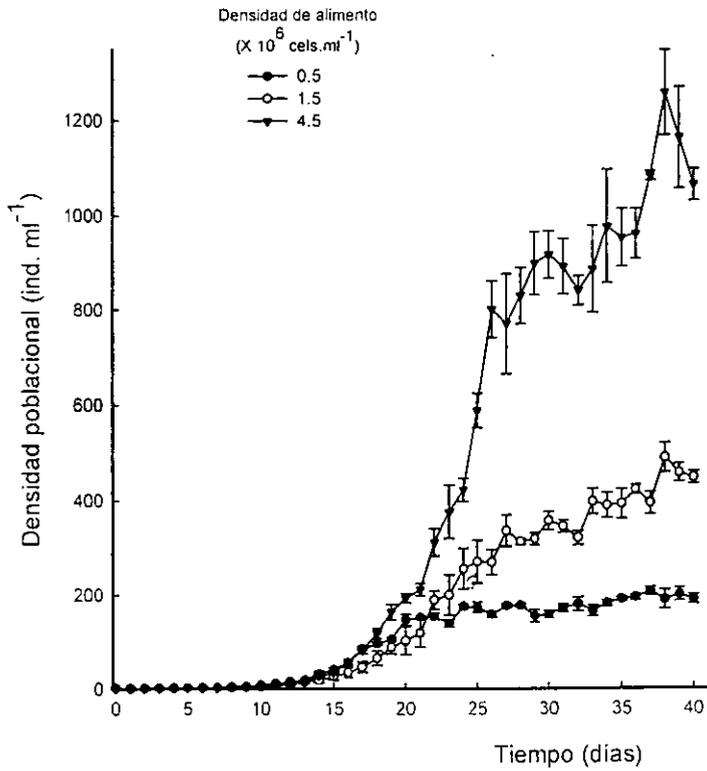


Fig. 11. Crecimiento poblacional de *B. patulus*, alimentado con diferentes concentraciones de *C. vulgaris* muerta en agua caliente. Los valores indican el promedio \pm el error estándar de tres repeticiones.

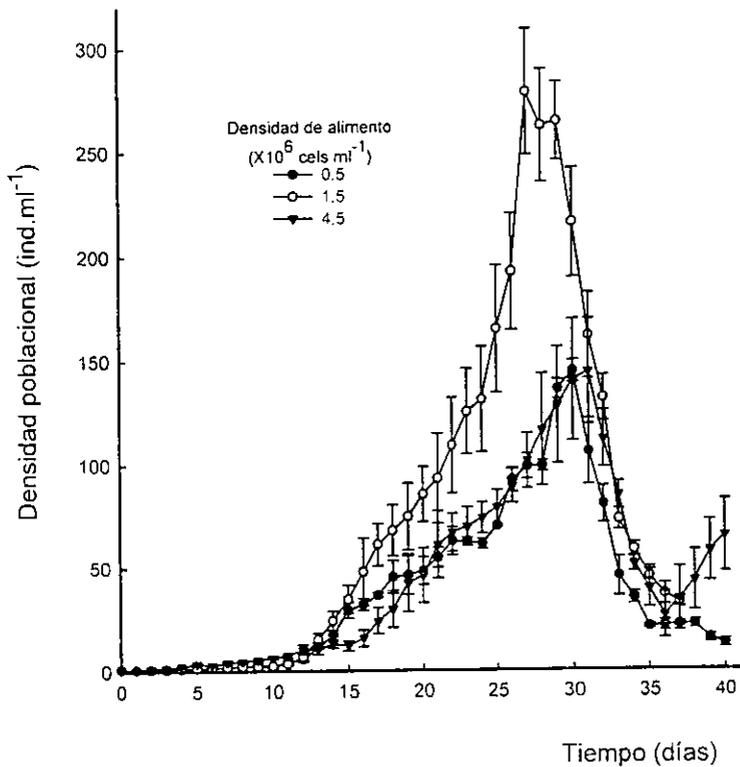


Fig. 12. Crecimiento poblacional de *B. patulus*, alimentado con diferentes concentraciones de *C. vulgaris* congelada. Los valores indican el promedio \pm error estándar de tres repeticiones.

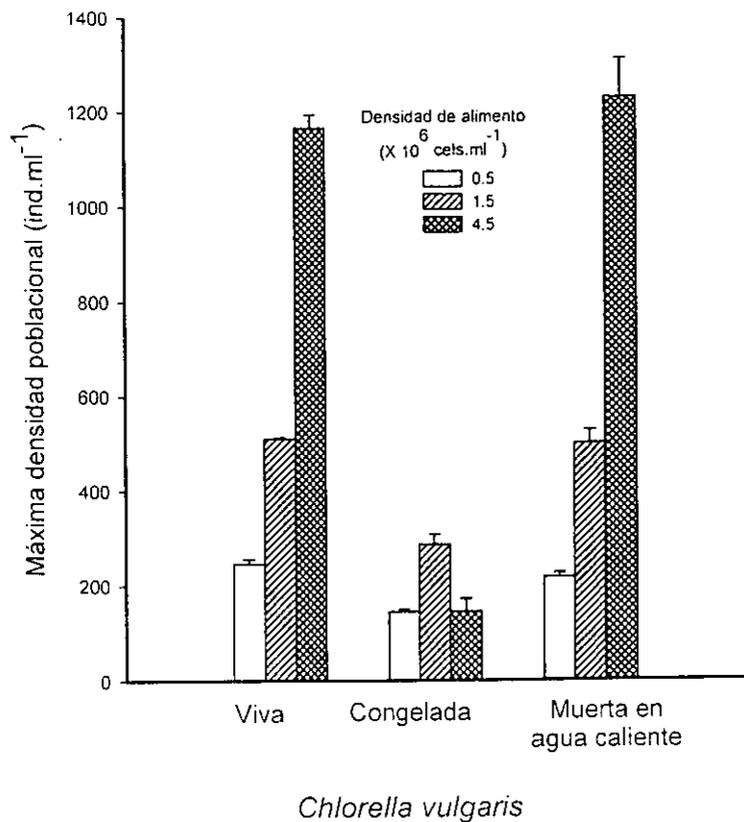


Fig. 13. Máxima densidad poblacional alcanzada por *B. patulus* con relación a diferentes concentraciones de *C. vulgaris* (viva y muerta). Los valores representan el promedio \pm error estándar de tres repeticiones.

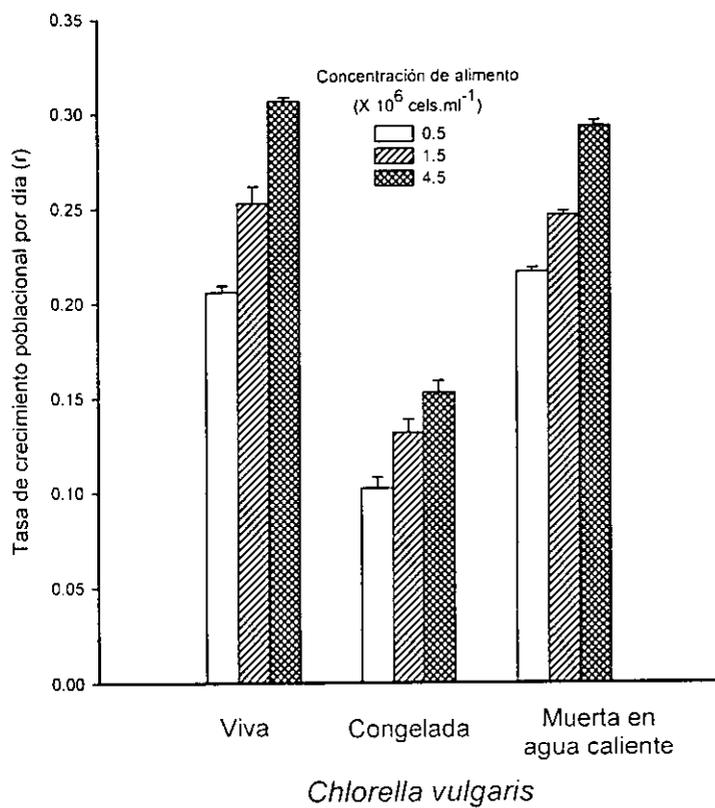


Fig. 14. Tasa de crecimiento poblacional por día de las poblaciones de *B. patulus*, con relación a diferentes concentraciones de *C. vulgaris* (viva y muerta). Los valores representan el promedio \pm error estándar de tres repeticiones.

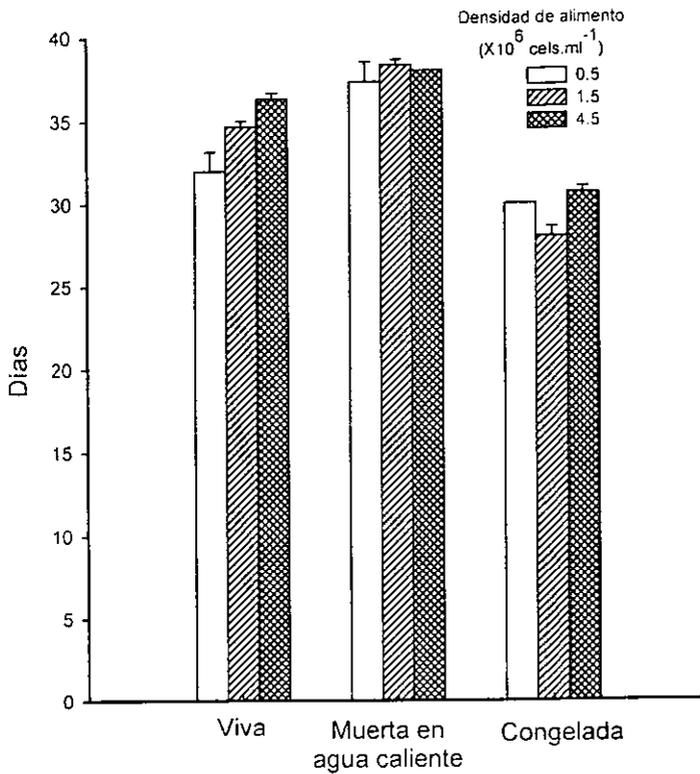


Fig. 15. Día de máxima población de *B. patulus*, con relación a diferentes concentraciones de *C. vulgaris* (viva y muerta). Los valores representan el promedio ± error estándar de tres repeticiones.

Tabla 4. Análisis de Varianza por dos factores de la máxima población alcanzada por *Brachionus patulus* con relación a diferentes formas (viva y muerta) y densidades de *C. vulgaris* (**=p<0.001).

Fuente de variación	GL	SC	SM	F
Forma del alga (A)	2	1916362.000	958181.00	294.10***
Densidad del alga (B)	2	1224238.000	612119.00	187.88***
Interacción (AXB)	4	1100397.000	275099.25	75.06***
Error	18	58644.000	3258.00	

Tabla 5. Análisis de Varianza por dos factores de la tasa de crecimiento poblacional por día de *Brachionus patulus* alimentado con diferentes formas y densidades de *C. vulgaris* (**=p<0.001 y **=p<0.05).

Fuente de variación	GL	SC	SM	F
Forma del alga (A)	2	0.026	0.01	169.65***
Densidad del alga (B)	2	0.093	0.05	604.43***
Interacción (AXB)	4	0.002	0.00	5.93**
Error	18	0.001	0.00	

Tabla 6. Análisis de Varianza por dos factores, del día de máxima población alcanzada por *B. patulus*, con relación al efecto de diferentes densidades y formas de *C. vulgaris* como alimento (***=p<0.001; **=p<0.05 y ns= no significativo).

Fuente de variación	GL	SC	SM	F
Forma del alga (A)	2	314.740	157.37	132.78***
Densidad del alga (B)	2	16.963	8.48	7.16**
Interacción (A X B)	4	24.814	6.20	4.65**
Error	18	21.334	1.19	-

DISCUSIÓN

Se conoce que la abundancia de los rotíferos en cultivo, depende en gran medida de la calidad nutritiva de las dietas que consumen, por ejemplo Hirayama *et al.* (1979) encontraron que no todas las especies de microalgas aportan altas cantidades de nutrimentos cuando son consumidas cuando realizaron pruebas con ocho especies de fitoplancton marino, de las cuales sólo evaluaron dos como excelente alimento para *Brachionus plicatilis*. Posteriormente, Smith (1991) encontró que las principales limitaciones que pueden presentarse a través de las microalgas se dan básicamente en relación al aporte de algunos elementos esenciales como el nitrógeno o el fósforo y de igual importancia, compuestos bioquímicos como aminoácidos, ácidos grasos o vitaminas.

Dentro de las especies de microalgas que se han utilizado como alimento en el cultivo de organismos de agua dulce, está bien establecido que el uso de *Chlorella* eleva la cantidad de aminoácidos y proteínas que asimilan los rotíferos y cladóceros (Kokova *et al.*, 1982), ya que la composición de la materia seca que se ha cuantificado en esta especie es 51-58 % de proteínas, 14-22 % de lípidos, 12-17 % de carbohidratos y 4-5 % de ácidos nucleicos (Becker, 1986).

Durante el desarrollo del presente trabajo, se empleó *Chlorella vulgaris* como alimento vivo, lo cual permitió el crecimiento poblacional adecuado, tanto de *Brachionus calyciflorus* como de *Brachionus patulus*. Esto se atribuye a que esta especie de alga presenta características nutritivas adecuadas para el cultivo de rotíferos (Vega-Quintero, 1996), por lo que anteriormente se ha utilizado con éxito en diferentes trabajos acerca del cultivo de *Brachionus calyciflorus* (Sarma *et al.*, 1997; Arévalo-Stevenson *et al.*, 1998; Larios-Jurado, 1999; Sarma *et al.*, 1999) y de *B. patulus* (Rao y Sarma, 1990). Es importante señalar que para obtener la máxima tasa de ingestión en *B. calyciflorus*, el tamaño óptimo de partículas es entre 5 y 10 μm (Routhaupt, 1990) y aunque *B. patulus* es de menor tamaño, *Chlorella vulgaris* también fue apropiada para su alimentación debido a que el diámetro correspondiente a las células es de 5 μm , tamaño considerado óptimo para la alimentación de otros braquiónidos de talla pequeña como *B. rubens* (Schlüter y Groeneweg, 1981).

Al respecto, Routhaupt (1990) observó que si una población de *B. calyciflorus* se alimenta con partículas de menor tamaño al óptimo, cuando se aumenta la concentración del alimento la tasa de filtración disminuye; en cambio la tasa de ingestión aumenta en

forma lineal hasta alcanzar un nivel máximo. Este nivel máximo está determinado por la relación entre la tasa de almacenamiento y el tiempo de permanencia de las células dentro del tracto intestinal.

En el estudio que hizo sobre aspectos de alimentación de rotíferos planctónicos, Stearweather (1980) describió como concentración crítica a la concentración de células disponibles como alimento, en la cual la tasa de ingestión es máxima y encontró que para *B. calyciflorus* es 5×10^5 cels ml^{-1} de *Chlorella* cuando la temperatura es de 20 ± 1 °C. Cabe señalar que esta concentración corresponde a la densidad de alimento más baja que se utilizó en el presente trabajo y las concentraciones más altas estuvieron dentro de los intervalos empleados en otros experimentos sobre el crecimiento poblacional de braquiúridos (Sarma *et al.*, 1996). Debido a que las máximas densidades de población que se obtuvieron en los tratamientos con *Chlorella vulgaris* viva, tanto en *B. calyciflorus* (Fig. 7) como en *B. patulus* (Fig. 13) fueron superiores a las obtenidas en trabajos anteriores, como el de Sarma *et al.* (1999) en donde los picos de abundancia que se alcanzaron fueron de hasta 81 ± 7 ind ml^{-1} en *B. calyciflorus* y 306 ± 13 ind ml^{-1} para *B. patulus* alimentados con 3×10^6 cel ml^{-1} , permite afirmar que las condiciones en las que se realizaron los tratamientos en el presente experimento fueron las adecuadas para el cultivo de ambas especies. Por un lado, el uso de iluminación en forma constante permite una mayor actividad de *B. calyciflorus* (Awaís *et al.*, 1992) y por otro, la temperatura seleccionada (22 ± 1 °C) se encuentra dentro del intervalo de temperaturas óptimas para el cultivo y alimentación de *B. patulus* (Sarma y Rao, 1990).

Del tratamiento establecido en el presente estudio con *C. vulgaris* viva, se encontró que las poblaciones tanto *B. calyciflorus* (Fig. 4) como *B. patulus* (Fig. 10) presentan mayor densidad poblacional en relación al aumento en la concentración de alimento. Lo cual indica que el alga aportó la energía necesaria para el metabolismo de los organismos, pues mediante su trabajo, Bennet y Boraas (1989) confirmaron la hipótesis de que existe una interrelación entre la energía que utilizan los rotíferos para su reproducción, crecimiento y mantenimiento; de tal forma que cuando los recursos fueron limitados se presentó un balance entre estas características. Por ejemplo, encontraron que cuando la condición del alimento es abundante, la longevidad de los individuos disminuye; de la misma manera, el tiempo de producción de los huevos disminuye y aumenta la fecundidad de las hembras, con lo que se aumenta la tasa de crecimiento.

Es importante señalar que se conoce que el tiempo de vida de los rotíferos se acorta cuando ocurren altas tasas de producción a temprana edad, por lo que se señala

que la óptima estrategia adaptativa que pueden presentar, consiste en aumentar la tasa de crecimiento específica (γ_{max}). Al respecto, Guisande y Mazuelos (1991) encontraron que *B. calyciflorus* maximiza su tasa de reproducción cuando se presentan altas concentraciones de alimento. En los resultados obtenidos para ambas especies en el presente estudio, se encontraron diferencias significativas (Tablas 3 y 6) entre los tratamientos y a mayor densidad de alimento las poblaciones requirieron de más tiempo (días) para alcanzar el máximo valor en ind ml⁻¹.

Sarma y Rao (1991) encontraron que en los cultivos de *B. patulus*, acorde al incremento en la temperatura también se aumentó el efecto de las altas concentraciones de alimento, con lo que se provocó la disminución del promedio de vida de los rotíferos. Por lo tanto, altos niveles de alimento y de temperatura contribuyen a reducir la edad de primera reproducción y con ello la madurez de los individuos se alcanza más rápido. En la naturaleza, los cladóceros y los copépodos tienen éxito gracias a su alta fecundidad, mientras que los rotíferos presentan una maduración rápida (temprana edad de primera reproducción) (Allan, 1976; Sarma, 1989). Cabe señalar que normalmente la fecundidad se refleja en el número de huevos por hembra; sin embargo, aunque en este estudio no se cuantificó esta característica, algunas veces, durante los conteos realizados, se encontraron pocos huevos cuando la abundancia poblacional era alta.

Al comparar las curvas de crecimiento poblacional en lo referente a densidad poblacional y días de duración de los cultivos, se observa que el comportamiento de ambas especies es diferente. Al igual que en los trabajos realizados por Larios-Jurado (1999) y Sarma *et al.* (1999) se encontró que la población de *B. patulus* alcanza mayor densidad que *B. calyciflorus*, pero el tiempo que requiere para ello es más largo. De tal forma que al iniciar los cultivos de ambas especies con 1 ind ml⁻¹ durante el presente estudio; en la población de *B. calyciflorus* la fase de declinación se produjo alrededor del día 14 (Figs. 4 a 6) mientras que en el cultivo de *B. patulus* ocurrió aproximadamente a los 40 días (Figs. 10 a 12). Por otra parte, la máxima densidad poblacional que se encontró en el cultivo de *B. patulus* fue de 1226 ± 82 ind ml⁻¹ (Fig. 13) lo que corresponde casi al triple de lo observado en la población de *B. calyciflorus* (Fig. 7). Estas diferencias se atribuyen a la diferencia de tamaño corporal entre ambas especies, ya que *B. calyciflorus* mide aproximadamente 175 μ m de largo y 128 μ m de ancho, mientras que *B. patulus* tiene alrededor de 97 μ m de largo y 101 μ m de ancho (Sarma *et al.*, 1999) y de acuerdo a los resultados obtenidos por Stemberger y Gilbert (1985) quienes estudiaron la relación entre diferentes concentraciones de alimento y la tasa de crecimiento para ocho especies

de rotíferos de diferente tamaño, existe una relación positiva entre el tamaño corporal y la tasa de crecimiento poblacional que presenta *B. calyciflorus* mide aproximadamente 175 μm de largo y 128 μm de ancho y *B. patulus* tiene alrededor de 97 μm de largo y 101 μm de ancho (Sarma *et al.*, 1999), por lo que cada especie. En *B. calyciflorus*, la especie de mayor tamaño, la tasa de crecimiento poblacional por día (r) en el tratamiento con *C. vulgaris* viva alcanza valores de hasta 0.79 día^{-1} con 4.5×10^6 cel ml^{-1} (Fig. 8), los cuales son más altos que los correspondientes al mismo tratamiento con *B. patulus* (Fig. 14), donde se obtuvo como máximo 0.33 día^{-1} para el mismo tratamiento.

Bennet y Boraas (1989) señalan que las especies pequeñas se alimentan con pequeñas cantidades de microalgas, por lo que parecen estar bien adaptadas a vivir en ambientes con escasez de alimento. Las especies grandes, en cambio, parecen estar restringidas a ambientes con abundancia de fitoplancton, donde pueden prosperar debido probablemente a su alto potencial reproductivo. También mencionan que *B. calyciflorus* es una especie relativamente grande que sólo se encuentra en cuerpos de agua eutróficos y en algunos casos puede presentar la tasa de crecimiento más alta de los metazoarios (hasta 2.0 día^{-1}) mientras que *Keratella cochlearis*, cuya talla es pequeña, presenta una tasa de 0.28 día^{-1} .

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, cabe destacar que el adecuado crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* se presentó únicamente al utilizar *C. vulgaris* viva como alimento (Figs. 4, 5 y 6). En cambio, cuando en el cultivo de *B. patulus* se utilizó *C. vulgaris* muerta en agua caliente como alimento, se obtuvo un crecimiento poblacional semejante al del tratamiento con alga viva (Figs. 10 y 11), debido seguramente al hecho de que *B. patulus* es una especie ticoplanctónica que normalmente habita cerca de macrófitas acuáticas y puede alimentarse satisfactoriamente del detritus y las algas epifitas presentes (Ruttner-Kolinsko, 1974; Sarma y Rao, 1990) mientras que *B. calyciflorus* es una especie completamente planctónica.

Aunque se ha considerado a las especies de *Brachionus* como consumidores "generalistas" con escasa habilidad para discriminar alimento (Rothhaupt, 1990), en el experimento realizado por Starkweather y Bogdan (1980) se probó que algunas especies pueden discriminar el alimento suministrado ya que encontraron que *Keratella cochlearis* se alimentó selectivamente de material detritico, mientras que *Conochilus dossuarius* y *Kellicottia bostoniensis* no mostraron habilidad para discriminar entre alimento vivo y muerto. En un estudio más fino sobre la relación entre el alimento y la conducta natatoria de los rotíferos, Charoy (1995) describió la presencia de receptores mecánicos y químicos

entre los cilios pseudotruncalés, además de células sensoriales presentes en el embudo bucal y el mástax de *B. calyciflorus*; de tal forma que una estimulación mediante la presencia de partículas alimenticias en el medio podría ser la causa que afecta la conducta natatoria de los individuos, al aumentar o disminuir su tasa de filtración.

El hecho que en las dos especies se presentara el más bajo crecimiento poblacional en el tratamiento con *C. vulgaris* congelada, puede atribuirse a la baja digestibilidad de ésta; pues en el análisis nutricional que realizó Becker (1986) en diferentes especies de microalgas, encontró que el porcentaje de digestibilidad en *Chlorella* fue menor al secarla por congelamiento (51%) que cuando se hirvió (77%). También se puede atribuir a la disminución en algún nutrimento ya que Dobberfuhr y Elser (1999), quienes alimentaron al cladóceros *Daphnia magna* con alga seca por congelamiento (-20 °C), encontraron que en el alga *Scenedesmus acutus* se disminuyen las concentraciones de amoníaco y fosfato después de 24 horas de secarla. Aunado a esto, se tiene la referencia de Rothaupt (1995), quien midió la tasa de ingestión del rotífero *B. rubens* alimentándolo con *Scenedesmus acutus* cultivada con limitaciones de nitrógeno y fósforo y encontró que el rotífero no diferencia entre el alga con y sin las limitaciones, ingiriendo ambas a tasas comparables; sin embargo, observó que en el caso del alga limitada en nitrógeno, a bajas concentraciones de ésta el crecimiento de la población fue semejante al control pero no así al suministrar altas concentraciones, ya que la tasa de máximo crecimiento poblacional se redujo significativamente reducida. El caso de los cultivos con alga limitada en fósforo la tasa de crecimiento poblacional fue negativa.

Respecto al uso de alga muerta como alimento, en el presente trabajo se encontró que aún cuando la población de *B. calyciflorus* no creció adecuadamente en los tratamientos, sí hubo reproducción entre los individuos ya que tanto en el tratamiento con alga muerta en agua caliente como en el de alga congelada la tasa de crecimiento poblacional por día resultó positiva (Fig. 7). Cabe señalar que este tipo de alimentación puede utilizarse en actividades dentro de la acuicultura, para mantener una población de rotíferos durante pocos días (2 ó 3), cuando no se cuenta con la cantidad suficiente de alga viva.

En adición a esto, el utilizar alga muerta en agua caliente como alimento en los cultivos de rotíferos, abre la posibilidad de utilizar la microalga que pudiera crecer abundantemente en cuerpos de agua naturales, ya que al utilizar agua caliente se eliminan los microorganismos que pudieran contaminar o dañar los cultivos de interés.

CONCLUSIONES

- ❖ Cuando los cultivos se mantienen en condiciones normales (alga viva como alimento), las dos especies presentan crecimiento poblacional en relación a la abundancia de alimento.
- ❖ La diferencia de tamaño en ambas especies determina que la tasa de crecimiento poblacional sea más alta en *B. calyciflorus* que en *B. patulus*.
- ❖ Independientemente de la forma de alimento suministrado, la respuesta que presentan las dos especies de braquióneos respecto a la densidad máxima y el tiempo requerido para alcanzar ésta es diferente, ya que con alga viva, después de casi 35 días, *B. patulus* alcanza cerca del triple de la población que *B. calyciflorus* alcanza a los nueve días.
- ❖ La población de *Brachionus calyciflorus* requiere de alga viva para crecer adecuadamente.
- ❖ La población de *Brachionus patulus* puede desarrollarse adecuadamente con alga muerta en agua caliente, debido a que es una especie ticooplanctónica con capacidad para alimentarse de detritus.
- ❖ Aunque el alga congelada no permite un buen crecimiento poblacional de ambas especies, puede permitir el mantenimiento de la población de rotíferos por 2 ó 3 días, cuando no se cuenta con alga viva.

LITERATURA CITADA

- Ahlstrom, E.H. 1940. A revision of the rotatorian genera *Brachionus* and *Platyas* with descriptions of the new species and two new varieties. Bulletin American Musseum of Natural History Vol. LXXVII. pp. 143-184.
- Allan, J.D. 1976. Life history patterns in zooplankton. Am. Nat. 110: 165-180.
- Anónimo, 1985. Methods of Measuring the acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms. US Enviroment Protection Agency. EPA/600/4-85/013.
- APHA, 1975. Standard Methods for Examination of wastewater. 12a. Ed. N.Y.
- Arévalo-Stevenson, R., Sarma, S.S.S. & Nandini, S., 1998. Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera:Brachionidae) in waste water from food-processing industry in México. Rev. Biol. Trop. 6:001-006.
- Awaís, A., Kestemont, P. & Micha, C. 1992. An investigation into the mass production of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. 1. An eco-physiological approach to nutrition. Aquaculture. 105:325-336.
- Bennett, W. N. & Boraas, M. E. 1988. Isolation of fast-growing strain of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. Using turbidostat culture. Aquaculture. 73: 27-36.
- Becker, E. W. 1986. Nutritional Propierties of microalgae potenciales and constraints. En Handbook of microalgal mass culture. Richmond, A. (ed.). CRC Pres, Inc. Florida. pp 339-420.
- Bogdan, K. G. & Gilbert, J.J. 1982. The effects of posterolateral spine length and body length on feeding rate in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. Hydrobiologia (89): 263-268.
- Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. 1988. Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, London.
- Castellanos-Páez, M. E.; Garza-Mouriño, G. y Marañón-Herrera S. 1999. Aislamiento, caracterización, biología y cultivo del rotifero *Brachionus plicatilis* (O.F. Müller). Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.
- Charoy, C. & Clement, P. 1993. Foraging behaviour of *Brachionus calyciflorus* (Pallas): Variations in the swimming path according to presence or absence of algal food (*Chlorella*). Hydrobiologia 255/256: 95-100
- Dobberfuhi, D.R. & Elser, J. J. 1999. Use of dried algae as a food source for zooplankton growth and nutrient release experiments. Journal of Plankton Research 5: 957-970.
- Edmonson, W. T. 1959. Rotifera en : Freshwater Biology. 2ª. Ed. John Wiley & sons Inc.

- Flores-Burgos, J. 1997. Estudio sobre los rotíferos como indicadores de calidad del agua. Tesis de Licenciatura U.N.A.M. ENEP Iztacala.
- Flores-Merchant, V. A. 1999. Estudio del género *Scenedesmus* Mayen 1829 en algunos cuerpos de agua del altiplano mexicano y su posible uso como indicador de la calidad del agua. Tesis de Licenciatura U.N.A.M. ENEP Iztacala.
- García, M. 1988. Biología y Cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*. Acuavisión 15:4-5.
- García-Morales, A. E. 1999. Análisis de la Asociación de Rotíferos, en sistemas temporales y permanentes Localizados en el Centro-Sur de México. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. ENEP Iztacala.
- García-Varela M, Pérez-Ponce de Leon G, De la Torre P, Cunnings MP, Sarma SSS & Laclette JP 2000. Phylogenetic relationships of Acanthocephala based on analysis of 18s ribosomal RNA gene sequences. J. Molecular Evol. 50: 532-540
- Gilbert, J. J., 1980. Further observations on developmental polymorphism and its evolution in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. Freshwater Biology, 10:281-294.
- Guisande C. & Mazuelos, N. 1991. Reproductive pattern of *Brachionus calyciflorus* Pallas at different food concentrations. Journal of Plancton Research. 12: 279-286.
- Heggemann, F., Schmelter, R. & Kleinow, W., 1998. Ribosomes of *Brachionus plicatilis* (Rotifera)- distribution in homogenate fractions and general properties. Hydrobiologia. 361:11-24.
- Hino, A. & Hirano, R., 1976. Ecological Studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*-I. General Aspects of bisexual reproduction inducing factors. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 10:1093-1099.
- Hino, A. & Hirano, R., 1977. Ecological Studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*-II. Effects of cumulative parthenogenetic generation on the frequency of bisexual reproduction. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 10:1147-1155.
- Hino, A. & Hirano, R., 1980. Relationship between body size of the rotifer *Brachionus plicatilis* and the maximum size of particles ingested. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 10:1217-1222.
- Hirata, H., 1980. Culture methods of the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. Min. Rev. Data File Fish. Res. 1:27-46.
- Hirayama, K. & Nakamura, K. 1976. Fundamental studies on the physiology of rotifers in mass culture--V. Dry *Chlorella* powder as a food for rotifers. Aquaculture. 414:250-264.

- Hirayama, K.; Takayi, K. & Kimura, H. 1979. Nutritional effects of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1: 11-16
- Hur, S. B. 1991. The selection of optimum phytoplankton species for rotifer culture during cold and warm seasons and their nutritional value for marine finfish larvae, en: Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of u.s. Asia Workshop. Honolulu. HI. pp 163-173.
- Iyer, N. & Rao, T. R., 1993. Effect of the epizoic rotifer *Brachionus rubens* on the population growth of three cladoceran species. Hydrobiologia. 255/256:325-332.
- King, Ch. E. & Miracle, M.R., 1980. A perspective on aging in rotifers. Hydrobiologia. 73:13-19.
- Krebs, C. J. 1985. Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance. 3rd edn. Harper and Row, New York. 789 p.
- Kokova, V. Y.; Trubachev, I. N. & Barashkov, V.A. 1982. Biochemical composition of certain aquatic invertebrates. Hydrobiological Journal. 4: 60-64.
- Koste, W. 1978. Rotatoria. Die Radertiere Mitteleuropas begründet Von Max Voigt. Monogononta Gedruder Borntraeger, Berlin, Stuttgart. I texto 673 pp. II Fig.. 234 pp.
- Larios-Jurado, P. S. 1999. Crecimiento poblacional de los rotíferos *Brachionus calyciflorus* Pallas, *B. patulus* (Müller) y *Asplanchna* (Leydig) en relación a diferentes alimentos bajo condiciones de laboratorio. UNAM. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala.
- Lubzens, E.; Marco, A & Tietz, A. 1985. De novo synthesis of fatty acids in the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture. 27: 27-37.
- Margalef, R. 1983. Limnología. Ediciones Omega. Barcelona. 1010 pp.
- Navarro, N. 1999. Feeding behaviour of the rotifers *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* with two types of food: live and freeze-dried microalgae. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 273:75-87.
- Navarro, N. & Yúfera, M. 1998. Influence of the food ration and individual density on production efficiency of semicontinuous cultures of *Brachionus*-fed microalgae dry powder. Hydrobiologia. 387/388: 483-487.
- Neumann-Leitão, S.; Carneiro-Lima, T. V. y do Amaral-Meneses, L., 1989. Cultivo experimental em laboratório do rotífero *Brachionus plicatilis* O.F. Müller com *tetraselmis tetrahele* (West). Arq. Biol.Tecnol. 32(4):709-718.
- Nogrady, T.; Wallace, R. L. & Snell, T. W. 1993. Rotifera. Volume 1: Biology, Ecology and Systematics. SPB Academic Publishing bv. 12 pp.
- Ooms-Wilms, A. 1998. On the food uptake and population dynamics of rotifers in a shallow eutrophic lake. Academisch Proefschrift. 150 pp.

- Osorio-Tafall, B. F. 1942. Rotíferos planctónicos de México I, II y III. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, Vol. III. Nos. 1-4. pp. 23-79 + 12 Figs.
- Pavón-Meza, E. L. 1993. Desarrollo de una técnica de cultivo para la producción masiva del rotífero *Brachionus calyciflorus*. Tesis de licenciatura U.N.A.M. ENEP Iztacala.
- Pejler, B. 1995. Relation to habit in rotifers. Hydrobiologia 313/314:267-278.
- Pennak, R. W. 1989. Fresh-water invertebrates in the United States. The Ronald-Press Co. New York. pp 168-187.
- Pourriot, J. 1980. The effect of some biotic and abiotic factors on the fertility of planktonic rotifer species. Hydrobiologia. 73: 59-62.
- Pourriot, R., 1991. Los rotíferos. Biología. En: Gilbert, B. Acuicultura. Vol. I. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 171-187.
- Rao, T. R. & Sarma, S.S.S. 1985. Mictic and amictic modes of reproduction in the rotifer *Brachionus patulus* Müller. Carr. Sci. 11: 499-501.
- Reyes-Bustamante, H. 1999. Evaluación y optimización de la producción de Microalgas, del rotífero *Brachionus plicatilis* y del cladóceros *Daphnia magna*; bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Doctorado. UNAM. ICMYL.
- Rico-Martínez, R. & Snell, T.W. 1997. Comparative binding of antibody to a mate recognition pheromone on female *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* (Rotifera). Hydrobiologia. 358:71-76.
- Ríos-Becerril, J.G. y Ramírez-Granados, R. 1987. Aislamiento y cultivo de rotíferos de agua dulce *B. rubens*. Memorias del Congreso Nacional de Zoología. Tomo I. pp.45-48
- Rodríguez, C.; Pérez, J. A.; Díaz, M.; Izquierdo, M. S.; Fernández Palacios, H. & Lorenzo, A., 1997. Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture. 150:77-89.
- Rothhaupt, K.O. 1990. Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species. Limnol.Oceanogr. 1:16-23.
- Rothhaupt, K.O. 1995. Algal nutrient limitation affects rotifer growth rate but not ingestion rate. Limnol.Oceanogr. 7:1201-1208.
- Ruttner-Kolisko, A. 1974. Plankton rotifers. Biology and taxonomy. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägeleu Obermiller) Stuttgart. Alemania. 146 pp.
- Sarma, S.S.S. 1985. Effect of food density on the growth of the rotifer *Brachionus patulus* Müller. Bull. Bot. Soc. Sagar. 32:54-59.
- Sarma, S.S.S. 1988. World trends in rotifers research. Biology Education. 4: 240-243.
- Sarma, S.S.S. 1991. Rotifers and Aquaculture. Environment & Ecology. 2:414-428.

- Sarma, S.S.S. 1996. Rotifer culture systems. In: International workshop on rotifer culture systems. UNAM Campus Iztacala, México. pp.28-56.
- Sarma, S.S.S. 1999. Checklist of rotifers (Rotifera) from Mexico. Environ. Ecol. 17: 978-983.
- Sarma S.S.S. & Elías-Gutiérrez, M. 1998. Rotifer diversity in a central mexican pond. Hidrobiología 387/388:47-54.
- Sarma S.S.S. & Elías-Gutiérrez, M. 1999. A survey on the rotifer (Rotifera) fauna of the Yucatán Peninsula (México). Rev. Biol. Trop. 47:187-196.
- Sarma, S. S. S.; Fernández-Araiza, M. A. & Amador-López, R. J. 1997. Influence of food concentration and inoculation density on the population growth of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera). Environment & Ecology. 2: 435-441.
- Sarma, S. S. S.; Fernández-Araiza, M. A. & Nandini, S. 1999. Competition between *Brachionus calyciflorus* Pallas and *Brachionus patulus* (Müller) (Rotifera) in relation to algal food concentration and initial population density. Aquatic Ecology. 33:339-345.
- Sarma, S. S. S. & Rao 1987. Effect of food level on body size and eggs size in a growing population of the rotifer *Brachionus patulus*. Arch. Hydrobiol. 2:245-253.
- Sarma, S. S. S. & Rao 1990. Population dynamics of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) in relation to food and temperature. Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.). 4: 335-343.
- Sarma, S. S. S. & Rao 1991. The combined effects of food and temperature on the life history parameters of *Brachionus patulus* Müller (Rotifera). Int. Revue ges. Hydrobiol. 2:225-239.
- Sarma, S. S. S., Arévalo Stevenson, R. & Nandini, S., 1998. Influence of food (*Chlorella vulgaris*) concentration and temperature on the population dynamics of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera) isolated from a subtropical reservoir in México. Ciencias Ergo Sum 1:77-81.
- Schlüter, M. 1980. Mass culture experiments whith *Brachionus rubens*. Hydrobiologia. 73: 45-50.
- Schlüter M & Groeneweg J 1981. Mass Production of Freshwater Rotifers on Liquid Wastes I. The Influence of Some Environmental Factors on Population Growth of *Brachionus Rubens* Ehrenberg 1838. Aquaculture 25: 17-24.
- Seaman. M. T.; Gophen, M.; Cavari, V.Z. & Azoulay, B. 1986. *Brachionus calyciflorus* Pallas as agent for the remobal of *E. coli* in sewage ponds. Hydrobiologia. 135:55-60.
- Segers, H.; Murugan, H. & Dumont, H. J. 1993. On the taxonomy of the Brachionidae: description of *Plationus* n.gen. (Rotifera, Monogononta). Hydrobiologia 268: 1-8.

- Sládeček, V. 1983. Rotifers as indicators of water quality. Hydrobiologia. 100 :169-201.
- Smith, V.H. 1991. Competition between consumers. Limnol. Oceanogr. 4: 820-823.
- Snell, T.W. 1991. Improving the design of mass culture systems for the rotifer, *Brachionus plicatilis*. Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceeding of a U.S.- Asia Workshop. Honolulu, Hi. The Oceanic Institute. pp 61-71.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf, 1985. Biometry (2nd edn). W.H. Freeman and Company, San Francisco. 859 pp
- Starkweather, P. L. 1980. Aspects of the feeding behavior and trophic ecology of suspension-feeding rotifers. Hydrobiologia 73:63-72.
- Starkweather, P. L. & Bogdan, K.G., 1980. Detrital feeding in natural zooplankton communities: discrimination between live and dead algal foods. Hydrobiologia 13: 83-85.
- Stemberger, R. & Gilbert, J., 1985. Body size, food concentration and population growth in planktonic rotifers. Ecology. 66(4):1151-1159.
- Stemberger, R. S., 1990. Food limitation, spination and reproduction in *Brachionus calyciflorus*. Limnol. Oceanography. 85 (1) : 33-44.
- Teshima, S.; Kanazawa, A.; Kamesaki, N. & Hirata, H. 1981. Fatty acids and sterol components of the rotifers cultured by a feed back system. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 47(4) : 515-521
- Torrentera-Bianco, L. 1983. Cultivo semicontinuo de *Chlorella saccharophila*. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. ENEP Iztacala.
- Vega-Quintero, M. S. 1996. Caracterización y análisis bromatológico de una cepa monoalgal: *Chlorella vulgaris* Beijerinck colectada de la atmósfera con posible uso en acuicultura. Tesis de licenciatura U.N.A.M.
- Vilaclara, G. & Sládeček, V. 1989. Mexican rotifers as indicators of water quality with description of *Collotheca rivierai* n.sp. Arch. Hydrobiol. 115 (2) : 257-263.
- Wallace, R. L. & Snell, T. W. 1991. Rotifera en: Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. James H. Trop y Alan (Eds) Academic Press Inc.
- Wetzel, R. G. 1981. Limnología. Omega. Barcelona. pp. 382-396.